Méthode d'essai biologique

Essais de toxicité sublétale en vue de l'évaluation des sédiments destinés à l'immersion en mer

Mai 2001

Division du milieu marin
Direction générale de la prévention de la pollution par les toxiques
Environnement Canada

Données de catalogage avant publication de la Bibliothèque nationale du Canada

Vedette principale au titre :

Méthode d'essai biologique. Essais de toxicité sublétale en vue de l'évaluation des sédiments destinés à l'immersion en mer.

(Rapport ; SPE 1/RM/40)
Publ. aussi en anglais sous le titre : Biological test method. Sublethal toxicity tests to assess sediments intended for disposal at sea.
Includes bibliographical references.
ISBN 0-662-85976-6
No de cat. En49-24/1-40F

1. Écotoxicologie -- Aspect de l'environnement.
2. Hydrobiologie -- Aspect de l'environnement.
3. Déchets -- Élimination dans la mer -- Aspect de l'environnement.
I. Canada. Environnement Canada.
II. Canada. Division du milieu marin.

QH90.8B40 2001 363.739'4

© Sa Majesté la Reine du chef du Canada (Environnement Canada) 2001

Commentaires

Les personnes qui désirent faire part de leurs commentaires sur la teneur du présent document sont priées de les adresser à :

Chef, Programme de l'immersion en mer
Division du milieu marin
Direction générale de la prévention de la pollution par les toxiques
Service de la Protection de l'environnement
Environnement Canada
Ottawa (Ontario)
K1A 0H3

tél. : (819) 953-2264
téléc. : (819) 953-0913

This publication is also available in English under the title: *Biological Test Method: Sublethal Toxicity Tests to Assess Sediments Intended for Disposal at Sea*. For copies, please contact:

Environmental Protection Publications
Environmental Protection Service
Environment Canada
Ottawa, Ontario
K1A 0H3

e-mail: epspubs@ec.gc.ca

102-04023/

Résumé

Le présent document expose les méthodes d'essai sublétal recommandées par Environnement Canada en vue de l'évaluation des sédiments marins ou estuariens destinés à l'immersion en mer. Les essais présentés ci-dessus ont été choisis parmi des méthodes qui ont été soumises à un examen par les pairs; ils peuvent aussi faire l'objet d'une publication sous titre séparé à d'autres fins. Ce document rassemble des méthodes d'essai sublétal convenant à l'évaluation des sédiments et permet d'adapter les méthodes en vue de l'immersion en mer.

Chaque chapitre de ce rapport présente une méthode complète qui peut être utilisée indépendamment de l'autre. Dans chaque chapitre, on décrit l'essai et les espèces recommandées. Le document présente également les modes de garde des espèces en laboratoire et de préparation de ces espèces en vue des essais. Les conditions et procédures d'essais sur les sédiments sont décrites. Le lecteur trouvera des directives concernant les installations d'essai, la manipulation et le stockage des échantillons, la préparation des solutions d'essai, la mise en route des essais, les conditions particulières, les observations et mesures appropriées, les mesures terminales, les méthodes de calcul et la validation de l'essai.

Abstract

This report describes methods recommended by Environment Canada for performing sublethal tests for the assessment of marine or esuarine sediments intended for disposal at sea. The tests assembled here are selected from peer-reviewed methods which may also be published independently for other purposes. This document provides a convenient consolidation of suitable sublethal methods and allows for a better vehicle to tailor methods specifically for ocean disposal assessment.

Each chapter in this report provides a complete method that can be used independently from the next. Within each chapter is a description of the test and of the species that can be used. Procedures are given for holding test species in the laboratory and preparing them for the testing phase. Conditions and procedures are outlined for testing sediments. Instructions are included for test facilities, handling and storing samples, preparing test solutions and initiating tests, specific test conditions, appropriate observations and measurements, endpoints and methods of calculations and validation of the test.

Avant-propos

Méthode d'essai biologique : Essais de toxicité sublétale en vue de l'évaluation des sédiments destinés à l'immersion en mer. (SPE 1/RM/40).

Le rapport, présenté en deux parties, rassemble deux méthodes complètes d'essai de toxicité sublétale qui conviennent à l'évaluation des sédiments destinés à l'immersion en mer. Ces méthodes peuvent être modifiées de temps à autre. Les modifications seront signalées dans le Registre de la LCPE, sur le site www.ec.gc.ca/RegistreLCPE.

Voici les deux méthodes :

Partie 1. Méthode d'essai biologique: Essai de toxicité sur la bactérie luminescente (*Photobacterium phosphoreum).* Cette méthode est aussi publiée séparément dans le rapport SPE 1/RM/24.

Partie 2. Méthode d'essai biologique: Essai sur la fécondation chez les échinides (oursins verts et oursins plats). Cette méthode est aussi publiée séparément dans le rapport SPE 1/RM/27.

Les rapports visent à orienter et à faciliter l'emploi de méthodes cohérentes, appropriées et exhaustives permettant d'obtenir des données sur la toxicité de certaines substances pour les formes de vie aquatiques.

Série de la Protection de l'environnement

Méthode d'essai biologique : essai de toxicité sur la bactérie luminescente *Photobacterium phosphoreum*

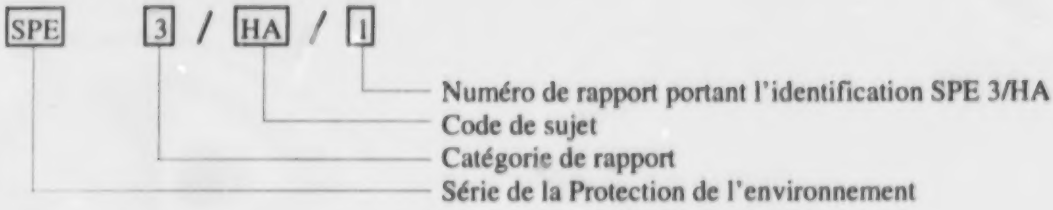
Rapport SPE 1/RM/24
Novembre 1992

Canada

Environnement Canada | Environment Canada

SÉRIE DE LA PROTECTION DE L'ENVIRONNEMENT

Exemple de numérotation :



Catégories

1 Règlements/Lignes directrices/ Codes de pratiques
2 Évaluation des problèmes et options de contrôle
3 Recherche et développement technologique
4 Revues de la documentation
5 Inventaires, examens et enquêtes
6 Évaluations des impacts sociaux, économiques et environnementaux
7 Surveillance
8 Propositions, analyses et énoncés de principes généraux
9 Guides

Sujets

AG Agriculture
AN Technologie anaérobie
AP Polluants atmosphériques
AT Toxicité aquatique
CC Produits chimiques commerciaux
CE Consommateurs et environnement
CI Industries chimiques
FA Activités fédérales
FP Traitement des aliments
HA Déchets dangereux
IC Chimie inorganique
MA Pollution marine
MM Exploitation minière et traitement des minéraux
NR Régions du Nord et rurales
PF Papier et fibres
PG Production d'électricité
PN Pétrole et gaz naturel
RA Réfrigération et climatisation
RM Méthodes de référence
SF Traitements de surface
SP Déversements de pétrole et de produits chimiques
SRM Méthodes de référence normalisées
TS Systèmes de transport
TX Textiles
UP Pollution urbaine
WP Protection/préservation du bois

Des sujets et des codes additionnels sont ajoutés au besoin. On peut obtenir une liste des publications de la SPE en s'adressant aux Publications de la Protection de l'environnement, Conservation et Protection, Environnement Canada, Ottawa (Ontario) K1A 0H3.

Printed on recycled paper

Imprimé sur du papier recyclé

Méthode d'essai biologique : essai de toxicité sur la bactérie luminescente *Photobacterium phosphoreum*

Protection de l'environnement
Conservation et Protection
Environnement Canada

Rapport SPE 1/RM/24
Novembre 1992

DONNÉES DE CATALOGAGE AVANT PUBLICATION (CANADA)

Vedette principale au titre:

Méthode d'essai biologique. Essai de toxicité sur la bactérie luminescente *Photobacterium phosphoreum*

(Rapport ; SPE 1/RM/24)
Publ. aussi en anglais sous le titre: Biological test method. Toxicity test using luminescent bacteria *(Photobacterium phosphoreum)*.
Comprend des références bibliographiques.
ISBN 0-662-98128-6
N° de cat. MAS En49-24/1-24F

1. *Photobacterium phosphoreum* -- Essais.
2. Organismes aquatiques -- Effet des substances toxiques sur -- Essais -- Méthodologie -- Normes -- Canada. 3. Effluents -- Qualité -- Essais -- Normes -- Canada. 4. Toxicité -- Tests -- Méthodologie -- Normes -- Canada. I. Canada. Direction générale de la protection de l'environnement. II. Canada. Environnement Canada. III. Titre: Essai de toxicité sur la bactérie luminescente *Photobacterium phosphoreum*. IV. Coll.: Rapport (Canada. Environnement Canada) ; SPE 1/RM/24.

QR82.V53B5614 1993 589.9'5 C93-099465-5

© Ministre des Approvisionnements et Services Canada 1993
No de catalogue En 49-24/1-24F
ISBN 0-662-98128-6
IMPRIMERIE BEAUREGARD LIMITÉE

Commentaires

Pour formuler des commentaires sur la teneur du présent rapport, s'adresser à :

Gary Sergy
Direction du développement technologique
Environnement Canada
4999, 98^{e} avenue, pièce 210
Edmonton (Alberta)
T6B 2X3

Richard Scroggins
Direction du développement technologique
Environnement Canada
Ottawa (Ontario)
K1A 0H3

This report is also available in English under the title *Biological Test Method : Toxicity Test Using Luminescent Bacteria* (Photobacterium phosphoreum). For copies, please contact:

Environmental Protection Publications
Conservation and Protection
Environment Canada
Ottawa, Ontario
K1A 0H3

Résumé

Le présent document expose les méthodes recommandées par Environnement Canada pour l'exécution d'essais de toxicité sur la bactérie luminescente Photobacterium phosphoreum.

Il présente les conditions et méthodes générales ou universelles permettant de réaliser des essais sur un large éventail de substances. On y précise aussi d'autres conditions et méthodes propres à l'évaluation d'échantillons de produits chimiques, d'effluents, de lixiviats, d'élutriats, de milieux récepteurs et de sédiments ou d'autres solides tels que des sols. Le lecteur y trouvera des instructions concernant la manipulation et le stockage des échantillons, les installations d'essai, la préparation des solutions d'essai et la mise en route des essais, les conditions prescrites pour les essais, les observations et mesures appropriées, les résultats des essais, les méthodes de calcul et l'utilisation de produits toxiques de référence.

Le résultat de l'essai est la concentration de l'échantillon qu'on estime qui cause une inhibition de 50 % de la production de lumière par la bactérie (c'est-à-dire la CI_{50}). L'estimation de cette valeur peut se faire après 5, 15 ou 30 minutes d'exposition.

Abstract

Methods recommended by Environment Canada for performing toxicity tests with the luminescent bacterium Photobacterium phosphoreum, *are described in this report.*

General or universal conditions and procedures are outlined for testing a variety of substances. Additional conditions and procedures are stipulated that are specific for assessing samples of chemical, effluent, leachate, elutriate, receiving water, and sediment or other solids such as soil. Included are instructions on sample handling and storage, test facilities requirements, procedures for preparing test solutions and initiating tests, specified test conditions, appropriate observations and measurements, endpoints, methods of calculation, and the use of reference toxicants.

The endpoint of the test is the concentration of sample which is estimated to cause 50% inhibition of light production by the bacteria (i.e., the IC50). This could be estimated after exposures of 5, 15, or 30 minutes.

Avant-propos

Le présent document fait partie d'une série de ***méthodes recommandées*** *pour mesurer et évaluer les effets bioaquatiques de substances toxiques. Ces méthodes ont été évaluées par Conservation et Protection et sont recommandées pour les applications suivantes :*

- *utilisation dans les laboratoires de toxicité aquatique de Conservation et Protection;*
- *essais confiés à des entrepreneurs par Environnement Canada ou demandés à des organismes ou à des entreprises de l'extérieur;*
- *remplacement d'instructions plus précises, comme celles prévues dans des règlements; et*
- *fondement pour l'établissement d'instructions très explicites pouvant être requises dans un programme de réglementation ou une méthode de référence normalisée.*

Les différents types d'essais compris dans cette série ont été choisis parce qu'ils étaient acceptables aux fins des programmes de protection et de gestion de l'environnement mis en oeuvre par Environnement Canada. Ces documents visent à fournir des lignes directrices et à faciliter l'utilisation de méthodes cohérentes, pertinentes et exhaustives pour recueillir des données sur les effets toxiques d'échantillons de produits chimiques, d'effluents, de lixiviats, d'élutriats, de milieux récepteurs et de sédiments ou de solides assimilés.

Dans le présent document, la mention d'appellations commerciales ne constitue nullement une recommandation de la part d'Environnement Canada; d'autres produits de valeur semblable peuvent être utilisés.

Table des matières

Résumé v
Abstract vi
Avant-propos vii
Liste des tableaux xii
Liste des figures xii
Liste des abréviations et des formules chimiques xiii
Glossaire xv
Remerciements xxiii

Section 1
Introduction 1
1.1 Contexte 1
1.2 L'essai et l'espèce bactérienne utilisée 3

Section 2
Organismes soumis à l'essai 7
2.1 Espèce 7
2.2 Source et conservation 7

Section 3
Système d'essai 8
3.1 Principes de l'essai et variabilité 8
3.1.1 Limites et reproductibilité 8
3.1.2 Interférence et autres limitations 9
3.2 Appareillage 9
3.2.1 Photomètre 9
3.2.2 Autre matériel 11
3.2.3 Fournitures 12
3.2.4 Organismes et réactifs 12

Section 4
Méthodes universelles 14
4.1 Caractéristiques de l'échantillon causant de l'interférence 14
4.1.1 Couleur, turbidité et particules flottables 14
4.1.2 pH 17
4.1.3 Oxygène dissous et aération 19
4.2 Préparation de l'essai 19
4.2.1 Préparation de l'analyseur de toxicité 19
4.2.2 Préparation des solutions d'essai 20
4.3 Mise en route de l'essai 22
4.3.1 Reconstitution du réactif bactérien 22

4.3.2 Mesures au temps zéro 23
4.4 Observations et mesures 23
4.5 Résultats et calculs 24
4.5.1 Estimation de la CI_{50} à l'aide d'un graphique 25
4.5.2 Estimation de la CI_{50} à l'aide d'une calculatrice ou d'un ordinateur 27
4.6 Produit toxique de référence 27
4.7 Considérations juridiques 29
4.8 Écarts par rapport aux méthodes de base 30
4.8.1 Essai de détermination de l'ordre de grandeur 30
4.8.2 Répétitions 30
4.8.3 Échantillon non dilué 30
4.8.4 Utilisation de sucrose pour ajuster la pression osmotique 32
4.8.5 Autres résultats 32
4.9 Méthode applicable aux échantillons colorés ou turbides 33

Section 5
Méthodes applicables à l'analyseur de modèle 500 36
5.1 Principales différences 36
5.2 Modifications particulières des méthodes 37

Section 6
Méthodes particulières pour l'essai de produits chimiques 39
6.1 Propriétés, étiquetage et stockage des échantillons 39
6.2 Préparation des solutions d'essai 39
6.3 Observations et mesures sur les échantillons 40

Section 7
Méthodes particulières pour l'essai d'échantillons d'effluents, de lixiviats et d'élutriats 41
7.1 Étiquetage, transport et stockage des échantillons . . . 41
7.2 Préparation des solutions d'essai 42
7.3 Eau de dilution 42
7.4 Observations et mesures sur les échantillons 44
7.5 Résultats et calculs 44

Section 8
Méthodes particulières pour l'essai d'échantillons de milieux récepteurs 45
8.1 Étiquetage, transport et stockage des échantillons . . . 45
8.2 Préparation des solutions d'essai 45
8.3 Eau de dilution 45

8.4 Observations et mesures sur les échantillons **46**
8.5 Résultats et calculs **46**

Section 9
Méthodes particulières pour l'essai d'échantillons de sédiments et de solides assimilés **47**
9.1 Généralités **47**
9.1.1 Étiquetage, transport et stockage des échantillons . . . **48**
9.1.2 Préparation des échantillons **48**
9.1.3 Observations et mesures sur les échantillons **48**
9.1.4 Sédiments de contrôle ou de référence **49**
9.2 Essai de liquides extraits de sédiments ou de solides assimilés **49**
9.2.1 Préparation des solutions d'essai **50**
9.2.2 Eau de dilution **51**
9.2.3 Résultats et calculs **51**
9.3 Essai d'une suspension solide-liquide **51**
9.3.1 Appareillage **51**
9.3.2 Préparation de la substance à expérimenter **52**
9.3.3 Mise en route de l'essai **52**
9.3.4 Résultats et calculs **53**

Section 10
Procès-verbal de l'essai **54**
10.1 Substance à expérimenter **54**
10.2 Organismes soumis à l'essai **55**
10.3 Installations et appareillage **55**
10.4 Méthodes et conditions d'essai **55**
10.5 Résultats de l'essai **55**

Références **57**

Annexe A
Membres du Groupe intergouvernemental sur la toxicité aquatique **63**

Annexe B
Adresses de l'Administration centrale et des bureaux régionaux de Conservation et Protection **65**

Annexe C
Exemple de format possible pour la présentation des résultats des essais Microtox **67**

Liste des tableaux

1 Liste de contrôle des conditions et méthodes d'essai recommandées 15

2 Comparaison des analyseurs Microtox des modèles 2055 et 500 36

Liste des figures

1 Schéma de la démarche adoptée pour définir les conditions et méthodes d'essai adaptées à différents types de substances 2

2 Aspect de l'analyseur de toxicité de Microbics (*Microbics Toxicity Analyzer*) de modèle 2055 et de l'enregistreur graphique 10

3 Exemple d'estimation de la CI_{50} à l'aide d'un graphique tracé à la main sur du papier logarithmique 26

4 Aspect de l'analyseur de modèle 500 utilisé pour l'essai Microtox 37

Liste des abréviations et des formules chimiques

ATP	adénosine-triphosphate
°C	degré Celsius
CE_{50}	concentration efficace 50
CI_p	concentration inhibitrice pour un pourcentage d'effet donné
CI_{50}	concentration inhibitrice 50
CL_{50}	concentration létale 50
cm	centimètre
d	jour
g	gramme
g/kg	gramme par kilogramme
h	heure
HCl	acide chlorhydrique
H_2O	eau
L	litre
MC	marque de commerce
mg	milligramme
min	minute
mL	millilitre
mm	millimètre
mS	millisiemens
N	normal
NaCl	chlorure de sodium
NaOH	hydroxyde de sodium

OD	oxygène dissous (concentration)
sp.	espèce
µg	microgramme
µL	microlitre
>	supérieur à
<	inférieur à
≥	supérieur ou égal à
≤	inférieur ou égal à
±	plus ou moins
%	pour cent
‰	parties par millier

Glossaire

Remarque : Toutes les définitions ci-après s'appliquent aux méthodes énoncées dans le présent rapport; il se pourrait qu'elles ne soient pas adaptées à d'autres contextes.

Verbes auxiliaires

L'auxiliaire *doit (doivent)* est utilisé pour exprimer une obligation absolue.

L'auxiliaire *devrait (devraient)* et le conditionnel d'obligation (*il faudrait*, etc.) sont utilisés pour indiquer que la condition ou la méthode en cause est recommandée et doit être respectée dans la mesure du possible.

L'auxiliaire *peut (peuvent)* indique qu'on est autorisé à faire une chose ou en mesure de la faire.

L'auxiliaire *pourrait (pourraient)* est utilisé pour indiquer la possibilité que quelque chose existe ou se produise.

Termes techniques généraux

Bioluminescence - Phénomène d'émission de lumière chez un organisme vivant par suite de ses activités biochimiques, généralement enzymatiques.

Conductivité - Expression numérique de la capacité d'une solution aqueuse de transporter un courant électrique. Cette capacité dépend de la concentration, de la valence et de la mobilité des ions en solution, ainsi que de la température de la solution. La conductivité des eaux douces s'exprime normalement en millisiemens par mètre (unité SI), ou en micromhos par centimètre (1 mS/m = 10 µmho/cm). La conductivité est une méthode courante de mesure de la salinité (*cf.* ce terme), le résultat étant normalement exprimé en grammes par kilogramme (g/kg) ou en parties par millier (‰).

Conformité - Fait de respecter les exigences du gouvernement en matière de réglementation ou de délivrance de permis.

Dispersant - Substance chimique qui réduit la tension superficielle entre l'eau et une substance hydrophobe (p. ex., du pétrole),

ce qui facilite la dispersion de cette substance dans l'eau sous forme d'émulsion.

Dureté - Concentration, dans l'eau, de cations réagissant avec une solution savonneuse de sodium pour entraîner la précipitation d'un résidu insoluble. En règle générale, la dureté correspond à la concentration d'ions de calcium et de magnésium dans l'eau et s'exprime en mg/L de carbonate de calcium ou l'équivalent.

Émulsifiant - Substance chimique qui facilite le mélange fin (sous forme de minuscules gouttelettes), dans l'eau, d'une substance normalement hydrophobe.

Floculation - Formation d'une agglomération de particules légères en suspension (floc) dans une solution.

Luminescent - Qui émet de la lumière pour une raison autre qu'une température élevée.

Lyophilisé - Qui a été soumis à une déshydratation à basse température et sous vide; les bactéries utilisées pour l'essai sont reçues du fournisseur dans cet état.

pH - Logarithme négatif de l'activité des ions d'hydrogène, mesurée par leur concentration en moles par litre. Cette valeur exprime le degré ou l'intensité des réactions acides et alcalines selon une échelle de 0 à 14, où le nombre 7 représente la neutralité et les nombres inférieurs correspondent, en ordre décroissant, à des réactions acides de plus en plus fortes; les chiffres supérieurs à 7 indiquent, en ordre croissant, des réactions basiques ou alcalines de plus en plus fortes.

Pourcentage (%) - Concentration exprimée en parties par centaine. Un pour cent représente une unité ou partie d'une substance (p. ex., effluent, élutriat, lixiviat ou milieu récepteur) diluée dans l'eau, jusqu'à concurrence de 100 parties. On peut préparer des concentrations en volume (*V/V*) ou en masse (*m/m*). On les exprime en pourcentage de la substance à expérimenter dans la solution finale.

Précipitation - Formation d'un solide (précipité) à partir d'une solution.

Prétraitement - Dans le présent rapport, traitement ou dilution d'un échantillon avant l'essai visant à établir sa toxicité.

Salinité - Quantité totale, en grammes, de solides dissous dans 1 kg d'une solution aqueuse. Dans le cas de l'eau de mer, elle se détermine après conversion de tous les carbonates en oxydes, après remplacement de tous les bromures et iodures par des chlorures et après oxydation de toutes les matières organiques. La salinité peut aussi se mesurer directement grâce à un salinimètre/conductimètre ou par d'autres moyens (APHA *et al.*, 1989). Dans le présent document, elle est exprimée en pourcentage, conformément à ce qui se fait dans les manuels Microtox. Elle s'exprime habituellement en grammes par kilogramme (g/kg) ou en parties par millier (‰), qui en représentent un équivalent approximatif.

Surfactant - Substance tensio-active (p. ex., détergent) qui, ajoutée à un liquide non aqueux, en réduit la tension superficielle et facilite la dispersion des matières dans ce liquide.

Surveillance - Activités de vérification de la qualité ou de collecte et de communication de données, effectuées de façon régulière (p. ex., quotidienne, hebdomadaire, mensuelle ou trimestrielle). Dans le contexte du présent rapport, ce terme s'applique soit à la vérification et à la mesure périodiques de certaines variables biologiques ou relatives à la qualité de l'eau, soit au prélèvement et à l'essai d'échantillons d'effluents, de lixiviats, d'élutriats ou de milieux récepteurs marins ou estuariens pour la mesure de leur toxicité.

Turbidité - Degré de réduction de la clarté de l'eau par la présence de matières en suspension ou autres qui entraînent la diffusion et l'absorption de la lumière, plutôt que sa transmission en ligne droite dans l'échantillon. La turbidité s'exprime généralement en unités de turbidité néphélométrique.

Termes désignant les substances servant aux essais

Contrôle - Traitement reproduisant l'ensemble des conditions et facteurs qui pourraient influencer les résultats d'une enquête ou d'une étude, à l'exception de la condition particulière faisant l'objet de cette étude. Dans un essai de toxicité aquatique, le contrôle doit reproduire toutes les conditions du ou des traitements d'exposition, sans porter sur la substance à expérimenter. Le contrôle est utilisé pour établir l'absence de toxicité mesurable en raison des conditions de base de l'essai (p. ex., qualité de l'eau de dilution, santé des organismes soumis à l'essai ou effets attribuables à leur manipulation).

Diluant - Eau normalisée servant à diluer la substance à expérimenter dans l'essai Microtox; *cf.* «eau de dilution».

Eau d'amont - Eau de surface (p. ex., d'un ruisseau, d'un cours d'eau, d'un lac, d'un estuaire ou d'une masse d'eau marine) qui n'est pas soumise à l'influence d'un effluent (ou d'une autre substance à expérimenter), du fait qu'elle se trouve contre le courant ou assez loin perpendiculairement à celui-ci.

Eau de dilution - Eau utilisée pour diluer la substance à expérimenter afin d'en préparer différentes concentrations en vue d'un essai de toxicité. L'eau de dilution utilisée dans l'essai Microtox est une formulation particulière d'eau salée appelée «diluant» (*cf.* ci-dessus).

Eau de porosité - Eau, à l'intérieur d'un sédiment (ou d'une substance assimilée), qui entoure les particules solides ou qui est entraînée par elles. La quantité d'eau de porosité s'exprime en pourcentage de la masse du sédiment humide.

Eau désionisée - Eau qu'on a purifiée pour en extraire les ions en la faisant circuler dans des colonnes de résine ou dans un système d'osmose inverse.

Eau distillée - Eau qu'on a traitée au moyen d'un appareil de distillation (au verre borosilicaté ou autre) pour en éliminer les impuretés.

Eau estuarienne - Eau saumâtre des parties côtières des océans résultant de la dilution mesurable de l'eau de mer par l'eau douce apportée par les cours d'eau.

Eau marine - Eau de mer qui se trouve ou qui est prélevée dans l'océan, dans la mer ou près des côtes, à un endroit où elle n'a pas subi de dilution appréciable par l'eau douce naturelle apportée par les cours d'eau.

Eaux usées - Terme général englobant les effluents, les lixiviats et les élutriats.

Effluent - Tout déchet liquide (p. ex., industriel ou urbain) rejeté dans l'environnement aquatique.

Élutriat - Solution aqueuse obtenue après avoir ajouté de l'eau à un déchet solide (p. ex., sédiments, stériles ou boues de forage ou de dragage), avoir agité le mélange, puis l'avoir centrifugé ou filtré ou avoir décanté le surnageant.

Lixiviat - Eau ou eau usée ayant traversé une colonne de sol ou de déchets solides dans l'environnement.

Milieu récepteur - Eau de surface naturelle (p. ex., d'un cours d'eau) qui a reçu un rejet de déchet ou qui est sur le point d'en recevoir un (p. ex., immédiatement en amont du point de rejet). D'autres termes doivent être employés afin de préciser lequel de ces deux sens s'applique dans le contexte.

Produit chimique - Dans le présent rapport, se dit de tout élément, composé, formule ou mélange de substances chimiques qui pourrait se retrouver dans l'environnement aquatique par déversement, application ou rejet. Les insecticides, les herbicides, les fongicides, les larvicides employés contre la lamproie marine et les agents de traitement des déversements de pétrole sont des exemples de produits chimiques qui se retrouvent dans l'environnement.

Produit toxique de référence - Produit chimique étalon utilisé pour mesurer la sensibilité des organismes soumis à l'essai afin d'établir les limites de confiance des données de toxicité recueillies sur une substance à expérimenter. Dans la plupart des cas, on procède à un essai de toxicité sur un produit toxique de référence afin d'évaluer la sensibilité des organismes au moment de l'étude d'une substance à expérimenter, ainsi que la précision des résultats obtenus par le laboratoire pour ce produit.

Sédiment - Substance naturelle formée de particules qui ont été transportées au fond d'une masse d'eau et qui s'y sont déposées. [Dans certaines sections du présent rapport, ce terme est employé, à des fins de commodité, pour désigner aussi des substances assimilées telles que des sols et des boues résiduelles d'installations industrielles et municipales.]

Solution mère - Solution aqueuse concentrée de la substance à expérimenter. Des volumes mesurés de la solution mère sont ajoutés à l'eau de dilution afin de préparer les solutions d'essai aux concentrations requises.

Substance - Type particulier de matière ayant des propriétés relativement uniformes.

Témoin - Dans le présent rapport, s'emploie de la même façon que le terme «contrôle» (*cf.* ci-dessus).

Termes de toxicologie

Aigu - Qui a lieu dans un bref intervalle par rapport à la durée de vie de l'organisme; il s'agirait d'un intervalle de l'ordre de quelques minutes pour des bactéries, et généralement de quatre jours ou moins pour des poissons.

CE_{50} - Concentration efficace 50 (ou médiane). Il s'agit de la concentration d'une substance dans l'eau qu'on estime qui cause un effet particulier chez 50 % des sujets qui y sont exposés. L'effet pourrait être létal mais est généralement sublétal. La CE_{50}, comme la CL_{50}, s'applique à un effet de type «tout ou rien», car chaque sujet exposé doit être classé comme ayant cet effet ou ne l'ayant pas. L'effet doit être précisé, et souvent aussi la durée d'exposition, par exemple «CE_{50} pour l'échec de la reproduction après deux mois» ou «CE_{50} pour les réactions d'évitement». Ce terme ne s'applique pas à une réduction d'un certain pourcentage d'une fonction donnée chez un organisme ou un groupe d'organismes; en conséquence, on ne devrait pas l'utiliser au sujet de l'essai Microtox (*cf.* «CI_p»).

CI_p - Concentration inhibitrice pour un pourcentage d'effet donné. Il s'agit d'une estimation ponctuelle de la concentration à laquelle la substance à expérimenter provoque une réduction donnée d'une fonction biologique mesurable, comme la production de lumière par des bactéries ou la croissance de poissons, par rapport à ce qu'on observe chez des témoins. Cette expression devrait être appliquée à tout essai toxicologique qui sert à mesurer la variation d'un phénomène mesurable, comme le taux de reproduction, la vitesse de croissance ou la fréquence respiratoire. (L'expression CE_{50}, ou concentration efficace 50, ne s'applique pas à des essais de cette nature parce qu'elle est limitée à des résultats de type «tout ou rien», comme le fait d'estimer que 50 % des organismes exposés à cette concentration subiraient un effet particulier, tandis que les autres 50 % ne manifesteraient aucun effet.)

CL_{50} - Concentration létale 50 (ou médiane). Il s'agit de la concentration d'une substance dans l'eau qu'on estime létale pour 50 % des organismes qui y sont exposés. La CL_{50} et ses limites de confiance à 95 % sont généralement obtenues par analyse statistique de la mortalité à plusieurs concentrations d'essai, après une durée d'exposition donnée. Cette durée

doit être précisée (p. ex., CL_{50} après sept jours). Ce résultat ne peut pas être employé avec l'essai Microtox.

Essai de toxicité - Détermination de l'effet d'une substance sur un groupe d'organismes choisis, dans des conditions définies. Un essai de toxicité aquatique permet généralement de mesurer soit le nombre d'organismes touchés par l'exposition à des concentrations particulières de produits chimiques, d'eaux usées, de milieux récepteurs ou de liquides provenant de sédiments ou de substances solides assimilées (effet de type «tout ou rien»), soit l'intensité des effets observés (effet mesurable). L'essai sur les bactéries luminescentes doit être considéré comme un essai de toxicité à résultat mesurable, car il ne sert pas à établir la proportion des bactéries qui sont directement touchées, mais plutôt le degré de réduction d'une fonction physiologique chez des groupes de bactéries.

Essai statique - Essai de toxicité pendant lequel les solutions d'essai ne sont pas renouvelées.

Évaluation d'identification de la toxicité - Prétraitement systématique d'un échantillon (p. ex., ajustement du pH, filtrage, aération), suivi d'un essai de toxicité. Cette évaluation permet de définir les agents qui sont les principaux responsables de la toxicité dans un mélange complexe. L'essai de toxicité peut être létal ou sublétal.

Létal - Qui entraîne la mort par action directe. On entend généralement par «mort» la cessation de tous les signes visibles de mouvement ou d'activité.

Résultat - Variable (p. ex., le délai, la réaction des organismes soumis à l'essai) indiquant la fin d'un essai; mesure ou valeur dérivée caractérisant l'effet de la substance à expérimenter (concentration létale, CI_{50}, etc.).

Sublétal - Nocif pour un organisme vivant, mais en deçà du niveau qui entraîne directement la mort pendant la durée de l'essai.

Toxicité - Capacité propre d'une substance de provoquer des effets nocifs chez des organismes vivants. Les effets pourraient être létaux ou sublétaux.

Remerciements

Le présent document a été rédigé en collaboration par J.B. Sprague (Sprague Associates Ltd., Guelph, Ont.) et D.J. McLeay (McLeay Associates Ltd., West Vancouver, C.-B.). Il est basé en grande partie sur les méthodes existantes de la société Microbics (cf. *section 1*). *MM. G.A. Sergy et R.P. Scroggins [Protection de l'environnement, Conservation et Protection (C. et P.), Environnement Canada] ont fait fonction de responsables scientifiques officiels et ont apporté leur collaboration et leurs conseils techniques pendant la durée des travaux.*

Les membres du Groupe intergouvernemental sur la toxicité aquatique (GITA) (cf. *annexe A*) *ont participé activement à l'élaboration et à l'examen du document et méritent tous nos remerciements. Nous tenons à souligner en particulier l'apport technique des membres du sous-comité du GITA qui s'est chargé de la première et de la dernière révision [G. Joubert (ministère de l'Environnement du Québec, Sainte-Foy, Québec), M. Korchinski (Alberta Energy Resources Conservation Board, Calgary, Alb.) et A.A. Qureshi (Alberta Environmental Centre, Vegreville, Alb.)] et celui de C. Blaise, B.J. Dutka, G. Elliott et G.C. van Aggelen, membres du GITA. Nous tenons également à remercier l'équipe des laboratoires d'essai d'Environnement Canada* (cf. *annexe B*). *M. P.C. Thomas, de l'ancienne société Microbics Enterprises (Forest, Ont.) a généreusement fourni la documentation technique et prêté l'équipement pour les essais.*

Les personnes suivantes, qui ont passé en revue des versions préliminaires ou la version définitive du présent rapport, ont offert des informations et de nombreux conseils utiles : C. Bastien (ministère de l'Environnement du Québec, Sainte-Foy, QC); Y. Bois (Technitrol-Eco, Pointe-Claire, QC); A.A. Bulich et M.W. Greene (Microbics Corp., Carlsbad, CA); J.E. Cairns (Dearborn Chemical Co. Ltd., Mississauga, Ont.); N.A. Casseri (OxyChem, Grand Island, NY); J. Coyle (U.S. Fish & Wildlife Service, Columbia, MO); K.G. Doe, M. Nicol et J.D.A. Vaughan (C. et P., Dartmouth, N.-É.); E. Dombroski (Alberta Environmental Centre, Vegreville, Alb.); J.I. Fujikawa (Alberta Environment, Lethbridge, Alb.); M.S. Henebry (Illinois Environmental Protection Agency, Springfield, IL); K. Ho (University of Rhode Island, Narragansett, RI); R.A. Hoke (AScI Corp., Duluth, MN); K.L.E. Kaiser et S. Skog (C. et P., Burlington, Ont.); L. Kennedy (Massachusetts Environmental Quality Engineering, Westborough, MA); G. Kurz

(Dept. of Public Works, Chattanooga, TN); E. Lee (B.C. Research, Vancouver, C.-B.); E.A. Power (E.V.S. Consultants, North Vancouver, C.-B.); Y. Roy (Analex Inc.); B. Salahub (Chemical & Geological Laboratories Ltd., Edmonton, Alb.); J. St-Onge (Stone-Consolidated Inc., Grand-Mère, QC); et S. Yee (C. et P., North Vancouver, C.-B.).

Les photographies de la page couverture ont été fournies par M. Christian Blaise, D.Sc., Direction de l'écologie et des écosystèmes, Centre Saint-Laurent, Environnement Canada.

Introduction

1.1 Contexte

Au Canada et ailleurs, on se sert d'essais de toxicité aquatique pour mesurer, prévoir et contrôler le rejet de substances qui pourraient être nocives pour les organismes aquatiques. On ne peut s'attendre à ce qu'un seul organisme ou une seule méthode d'essai répondent aux besoins d'une démarche globale en matière de conservation et de protection de l'environnement. C'est pourquoi le Groupe intergouvernemental sur la toxicité aquatique (GITA, *cf.* annexe A) a proposé l'élaboration et la normalisation d'une série d'essais de toxicité aquatique qui seraient généralement acceptables et qui permettraient de mesurer différents types d'effets toxiques chez des organismes représentatifs de différents niveaux trophiques et groupes taxinomiques (Sergy, 1987). Un essai de toxicité sur des bactéries luminescentes était l'un des essais de toxicité aquatique qu'on a choisis pour aider à respecter les exigences d'Environnement Canada en matière d'essais[1].

Le présent rapport décrit des méthodes universelles qui s'appliquent à tout essai sur des bactéries luminescentes. Il présente également des ensembles particuliers de conditions et de méthodes, prescrits ou recommandés lorsqu'on applique cet essai à l'évaluation de différents types de substances (à savoir des échantillons de produits chimiques, d'effluents, de lixiviats, d'élutriats, de milieux récepteurs et de sédiments ou d'autres substances solides) (*cf.* figure 1). Les méthodes et conditions applicables à la conduite de l'essai et à sa normalisation sont définies et, au besoin, expliquées dans des notes en bas de page.

Bien que l'on puisse dire de façon générale que cet essai vise à mesurer la luminescence d'une souche bactérienne, les méthodes exposées ci-après ne s'appliquent qu'au seul système d'essai qui était disponible dans le commerce au Canada au moment de la rédaction du présent rapport[2], soit l'essai Microtox^{MC}. La méthode d'essai décrite ci-après est la propriété exclusive de la société Microbics de Carlsbad (Californie).

Microbics fournit des instructions détaillées pour l'exécution de l'essai; le présent rapport ne les remplace pas, mais il les résume plutôt afin d'en faciliter l'apprentissage, de fournir des conseils utiles et de les compléter. Les méthodes d'essai que l'on peut obtenir chez Microbics et auprès d'organismes gouvernementaux ou internationaux n'abordent pas nécessairement toutes les questions importantes pour les laboratoires de toxicité aquatique du gouvernement canadien. Elles ne traitent pas forcément de questions telles que la manipulation de différents types d'échantillons, l'ajustement du pH, la modification des méthodes en fonction des objectifs des essais ou des types d'échantillons, ou encore le traitement des

---

1 Suivant la recommandation du GITA, on a déjà publié cinq méthodes relatives à des essais portant sur des poissons et des crustacés (Environnement Canada, 1990a, 1990b, 1990c, 1992a et 1992b).

2 Une méthode et des produits semblables et compétitifs (LUMIStox^{MC}) sont maintenant commercialisés au Canada par la société Intersciences Inc. (169 Idelma Rd., Markham (Ont.), L3R 1A9; C.P. 1311, Edmonton (Alb.), T5J 2M8; tél.: 1-800-661-6431).

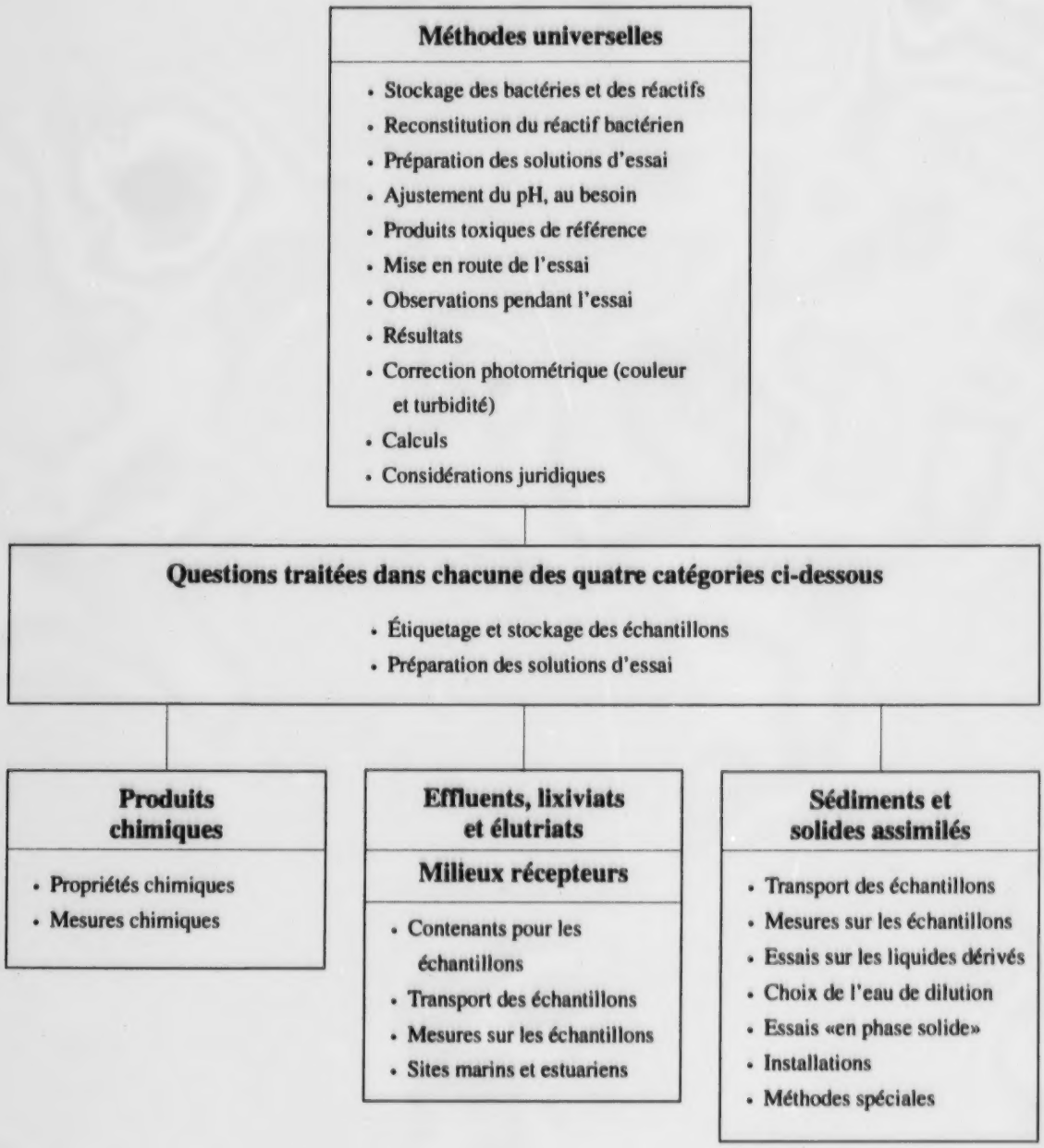


Figure 1 **Schéma de la démarche adoptée pour définir les conditions et méthodes d'essai adaptées à différents types de substances**

échantillons qui contiennent des quantités importantes de matières solides ou flottantes. Les documents méthodologiques existants décrivent généralement des méthodes applicables à l'analyse d'échantillons d'effluents ou de produits chimiques, mais ils ne fournissent parfois qu'un minimum de renseignements sur l'analyse d'échantillons de lixiviats, d'élutriats, de milieux récepteurs et de sédiments ou de solides assimilés.

En décrivant les méthodes figurant dans le présent document, on s'est efforcé de mettre en balance des considérations scientifiques, pratiques et financières, en plus de veiller à ce que les résultats soient assez exacts et précis pour la majorité de leurs cas d'application. Les auteurs ont supposé que le lecteur connaît déjà, dans une certaine mesure, les essais de toxicité aquatique. Le lecteur ne trouvera pas ici d'instructions explicites sur chaque détail, car il peut les obtenir dans les guides Microtox.

1.2 L'essai et l'espèce bactérienne utilisée

L'essai Microtox utilise une souche particulière de la bactérie marine *Photobacterium phosphoreum*[3] pour la détermination de la toxicité d'échantillons. Cette bactérie émet de la lumière au cours de son processus métabolique normal, et l'on mesure sa luminescence au moyen d'un photodétecteur normalisé, dans des conditions définies. La diminution de la luminescence après 5, 15 ou 30 min d'exposition sert de mesure de la toxicité.

L'essai de toxicité Microtox a été préparé commercialement et mis en vente pour la première fois en 1978. À l'heure actuelle, il se vend et est utilisé dans le monde entier, et il existe une vaste documentation scientifique portant sur cet essai et ses résultats (Bulich, 1986; Microbics, 1989a). Les chercheurs canadiens Kaiser et Ribo (1988) ont rassemblé une banque de données toxicologiques de grande envergure sur l'essai Microtox. L'essai de bioluminescence bactérienne ne se limite pas aux polluants en milieu aquatique; par exemple, l'USP (*United States Pharmacopeia*) envisage de s'en servir pour analyser des substances utilisées dans la fabrication de contenants pour des médicaments et des instruments médicaux (USP, 1989).

L'existence de données de toxicité obtenues antérieurement grâce à cet essai, sa sensibilité éprouvée aux polluants en milieu aquatique et sa très grande accessibilité, puisque c'est une technique normalisée, en font un choix logique comme outil d'analyse pour les laboratoires canadiens[4]. L'essai Microtox a fait l'objet d'études comparatives avec 50 autres essais à petite échelle (Munkittrick and Power, 1989); il a été reconnu comme étant «très utile pour l'analyse préliminaire d'échantillons sur le terrain», et il a obtenu une cote élevée de «validité sur le plan environnemental» (c.-à-d. de concordance avec les effets globaux observés chez des poissons et des crustacés). Au moins une province a adopté une méthode Microtox normalisée (BNQ, 1987), et d'autres provinces

---

3 Il existe de nombreuses souches de cette bactérie, et l'on sait que certaines d'entre elles diffèrent des autres quant à leur sensibilité aux substances toxiques. Pour l'essai Microtox, Microbics a choisi la souche NRRL B-11177, déposée au *Northern Regional Research Laboratory* à Peoria, Illinois (É.-U.).

4 L'utilisation de cet essai ne constitue nullement une recommandation de la part d'Environnement Canada ou de l'un ou l'autre de ses laboratoires.

disposent de documents non officiels décrivant la méthode dans ses grandes lignes (*cf.* 1.2.1). En Colombie-Britannique, on a choisi l'essai Microtox pour surveiller, trois fois par semaine, les effluents de certaines usines de pâte à papier.

L'essai est particulièrement utile pour le dépistage ou la surveillance en raison de sa rapidité, de sa simplicité, du faible volume des échantillons et de son coût minime, une fois que l'on dispose du photomètre ou analyseur (*Analyzer*[5]). Il convient à l'évaluation de la toxicité à court terme d'effluents urbains ou industriels, de lixiviats, d'élutriats, d'eaux de surface dans des zones de mélange, de produits chimiques, de substances toxiques libérées par des sédiments ou des sols et, en fait, de toutes les substances qui pénètrent dans l'eau à partir de sources diverses. Avec l'essai Microtox, on peut également analyser directement des échantillons de sédiments ou d'autres substances semi-solides comme les boues résiduelles d'installations municipales ou industrielles; l'essai a aussi été recommandé pour l'analyse des sols de sites de déchets contaminés (EPA, 1987, 1989c). On pourrait l'employer pour évaluer les progrès de la détoxication ou de la biodégradation de substances toxiques.

L'essai est pratique parce qu'il n'est pas nécessaire de conserver une culture de bactéries vivantes; on achète des bactéries lyophilisées que l'on peut entreposer pendant plusieurs mois, tout comme un réactif chimique. Cette caractéristique rend l'essai Microtox pratique pour des comparaisons chronologiques de la toxicité mesurée sur le terrain à une usine ou un endroit donné. La rapidité de l'analyse et la possibilité de faire de nombreux essais sans beaucoup de frais supplémentaires facilitent la mise en oeuvre de vastes programmes de dépistage de la toxicité d'effluents ou de produits chimiques, de détermination des constituants toxiques d'un rejet complexe, ou d'autres recherches de grande envergure. Par exemple, l'essai a été utilisé lors de relevés sur de grandes sections du fleuve Saint-Laurent (Kaiser *et al.*, 1988a).

En général, la sensibilité de cet essai équivaut à celle d'essais de létalité aiguë portant sur des poissons (Munkittrick et Power, 1989; Munkittrick *et al.*, 1991). Comparativement aux essais de létalité portant sur la tête-de-boule, la truite et la daphnie, l'essai Microtox est à peu près aussi sensible aux composés organiques purs, aux eaux usées urbaines et aux effluents industriels les plus toxiques, mais il est souvent moins sensible aux produits toxiques inorganiques et aux pesticides (Munkittrick et Power, 1989; Munkittrick *et al.*, 1991).

Par rapport à un essai sur une espèce particulière de poisson ou d'autre organisme pluricellulaire, l'essai Microtox peut présenter une variation importante de la sensibilité à une substance toxique donnée; dans certains cas, on obtient des différences de quelque cent fois, en plus ou en moins (Munkittrick *et al.*, 1991). Cela ne constitue pas nécessairement un désavantage, car les microorganismes sont parfois au nombre des espèces les plus sensibles dans les écosystèmes aquatiques, et l'on recommande de toujours en utiliser pour les évaluations de la toxicité (Slooff *et al.*, 1983). Cette recommandation est conforme à l'excellent principe qui prévoit l'utilisation d'une série

---

5 Dans le présent rapport, on a adapté en français la terminologie utilisée par Microbics pour les réactifs, l'appareillage et la marche à suivre. Toutefois, pour permettre à l'utilisateur de travailler plus facilement avec les guides de Microbics, qui ne sont disponibles qu'en anglais, chaque terme est suivi, à sa première occurrence ou plus fréquemment au besoin, de son équivalent anglais (en italique et entre parenthèses).

d'essais de toxicité. Pour certaines substances toxiques, l'organisme le plus sensible peut être un invertébré ou un microorganisme, tandis que pour d'autres, ce sera un poisson ou une plante. Pour protéger un écosystème aquatique, on devrait donc disposer de renseignements sur la toxicité chez divers organismes. Il s'ensuit naturellement que l'on ne devrait pas s'attendre à ce qu'un type d'organisme permette de prévoir la sensibilité d'un autre type d'organisme. Il ne faudrait pas supposer qu'un essai Microtox permettra de prédire les résultats d'un essai avec la truite, ou qu'un essai avec la truite permettra de prévoir le résultat d'un essai Microtox. Il faudrait plutôt considérer que l'absence d'une corrélation de ce genre prouve encore davantage qu'il est souhaitable d'effectuer des essais sur divers organismes.

Photobacterium phosphoreum est un organisme marin, et l'essai Microtox se fait normalement à une salinité de 2 %, obtenue par l'addition à l'échantillon d'une solution d'ajustement de la salinité (ou de NaCl) et par l'utilisation d'une eau de dilution ou diluant (*Diluent*) dont la salinité est de 2 %. La bioluminescence de la bactérie est aussi élevée à une salinité de 2 % que dans de l'eau de mer non diluée, dont la salinité est d'environ 3,5 %; toutefois, elle varie légèrement à l'intérieur de cet intervalle, l'intensité maximale étant observée à 2,7 % (Krebs, 1983). Par conséquent, on peut analyser des échantillons d'eau de mer non diluée si on le désire, mais il est important d'effectuer le test à une salinité d'au moins 2 %.

Il se pourrait que la toxicité d'une substance donnée en eau douce soit différente de celle mesurée en eau salée et que les résultats de l'essai Microtox conviennent peut-être moins bien à la protection des eaux douces. Cependant, la plupart des substances toxiques communes ont la même toxicité chez les organismes d'eau douce que chez les organismes marins, lorsque chaque organisme est étudié dans son propre milieu (Sprague, 1985). L'expérience prouve que l'essai Microtox donne généralement des résultats de toxicité semblables à ceux des essais de létalité aiguë portant sur des organismes d'eau douce (Blaise *et al.*, 1987; Munkittrick *et al.*, 1991); il compte donc parmi les outils d'étude de la toxicité en eau douce. L'addition de sucrose, au lieu de sels, pour ajuster la pression osmotique des solutions pourrait s'avérer un choix pertinent pour les analyses de toxicité en eau douce (*cf.* 4.8.4).

Au Canada, on peut se procurer chez Microbics[6] les guides techniques, la souche bactérienne spécifique, les fournitures et le matériel requis pour l'essai Microtox. Les premiers guides préparés par Microbics sont inclus dans la liste des références (Microbics, 1988a, 1988b et 1989b); la société a publié récemment un guide mis à jour et complet (Microbics, 1992). Un manuel d'instructions plus ancien (Beckman, 1982) fournit des détails utiles concernant certains aspects des essais. Divers documents sur les applications de l'essai («*Microtox Application Notes*») sont énumérés dans la section des références (*cf.* Microbics, 1983), et certaines applications particulières sont traitées dans les guides généraux (Microbics, 1989b);

---

6 Les numéros de téléphone et de télécopieur pour communiquer avec Microbics sans frais à partir du Canada sont respectivement 1-800-245-7629 et 1-800-528-5558. L'adresse de la société est : Microbics Corporation, 2232 Rutherford Road, Carlsbad, California 92008, U.S.A. La mention de produits commerciaux et de leurs fournisseurs ne constitue nullement une recommandation de la part d'Environnement Canada ou de l'un ou l'autre de ses laboratoires; ces renseignements sont fournis pour la commodité du lecteur.

elles concernent des sujets précis, dont une méthode rapide de dépistage, les effluents complexes et les eaux souterraines. On peut se procurer, chez Microbics, une vidéocassette de formation qui constitue un guide utile pour l'exécution de l'essai. Une bibliographie énumère les travaux de chercheurs qui ont utilisé et évalué l'essai Microtox (Microbics, 1989a).

Le Québec possède une méthode Microtox officielle (BNQ, 1987). Des guides techniques ont été produits par deux organismes du gouvernement de l'Alberta, soit l'*Energy Resource Conservation Board* (Alberta, 1986) et le ministère de l'Environnement (Alberta, 1987). En Alberta, l'essai Microtox est utilisé couramment pour analyser des extraits d'hydrocarbures, des liquides de forage, des sols et des sédiments, ainsi que des produits chimiques et des eaux. Un comité officieux d'utilisateurs de l'essai Microtox dans l'Ouest canadien (*Western Canada Microtox Users Comittee*) a effectué des essais comparatifs interlaboratoires et a facilité la normalisation. Le ministère de l'Environnement de la Colombie-Britannique possède un document d'orientation interne relatif à cet essai. Environnement Canada a également préparé un guide méthodologique sur le sujet (Dutka, 1988). Une brève description d'un mode opératoire normalisé a été préparée par un centre d'essais de l'*Environmental Protection Agency* des États-Unis (EPA, 1989b). En Allemagne, la version préliminaire d'une méthode normalisée (DIN, 1989) fournit des instructions générales concernant l'utilisation d'un photomètre et la préparation de solutions. Les instructions contenues dans le document allemand correspondent à la méthode Microtox, sans mentionner le nom de cette méthode ni la société Microbics; toutefois, on y précise que les bactéries lyophilisées sont vendues commercialement. Tous ces documents ont été utilisés au cours de la préparation du présent rapport et, en général, ils décrivent tous la même méthode.

Section 2

Organismes soumis à l'essai

2.1 Espèce

Les organismes soumis à cet essai proviennent d'une culture normalisée et appartiennent à une souche particulière de *Photobacterium phosphoreum*, appelée «NRRL B-11177». Cette bactérie vit normalement dans les océans et produit continuellement, en présence d'une quantité suffisante d'oxygène, une lumière bleu-vert résultant de réactions enzymatiques.

2.2 Source et conservation

On peut se procurer la culture bactérienne normalisée chez Microbics. D'après Microbics, les bactéries proviennent d'une souche génétiquement homogène; elles sont récoltées au cours de la phase exponentielle de croissance puis lyophilisées (c.-à-d. déshydratées à basse température et sous vide). On achète les bactéries sous cette forme, en petits lots dans des contenants scellés dont chacun peut servir à des essais pendant au moins 2 h après la reconstitution des bactéries au stade actif[7].

Lorsque le contenant de réactif bactérien (*Bacterial Reagent*) lyophilisé est conservé dans un congélateur à -20 °C, son contenu demeure stable pendant un an (Microbics, 1989b). La durée de stockage peut être prolongée quelque peu à -40 °C, mais le stockage dans un réfrigérateur à 4 °C la raccourcit grandement (Microbics, 1992). La température de stockage devrait être constante; il ne faudrait donc pas utiliser de réfrigérateurs ou de congélateurs à dégivrage automatique ou «sans givre».

On ramène les bactéries au stade actif ou vivant de réactif reconstitué (*Reconstituted Reagent*) en y ajoutant une solution de reconstitution (*Reconstitution Solution)* et en haussant leur température jusqu'à 5 °C.

---

7 Pour plus de renseignements sur la durée de travail utile des bactéries reconstituées, *cf.* 4.3.1.

Section 3

Système d'essai

3.1 Principes de l'essai et variabilité

Des sous-échantillons de réactif bactérien reconstitué sont mis en présence de diverses concentrations de l'échantillon, à raison d'environ un million de bactéries dans chaque cuvette. On postule que toute action toxique des substances présentes dans l'échantillon influe sur les processus métaboliques des bactéries et que l'inhibition de la bioluminescence est proportionnelle à l'effet sur le métabolisme. Cette inhibition est mesurée et exprimée sous forme de CI_{50} (soit la concentration qui provoque 50 % d'inhibition[8]) après des durées d'exposition déterminées (5, 15 ou 30 min, ou toutes ces durées).

3.1.1 Limites et reproductibilité

On effectue à la main toutes les manipulations de l'échantillon et des bactéries. La reconstitution des bactéries, le maniement du micropipetteur, le mélange des solutions, etc. dépendent donc de l'habileté de l'analyste. La variabilité des volumes transférés par un bon analyste pourrait être à l'origine d'une incertitude d'environ 1 % des mesures photométriques. Un autre pour cent de variation pourrait être attribuable aux variations géométriques dans la fabrication des cuvettes (Beckman, 1982).

Le ministère de l'Environnement du Québec (BNQ, 1987) a effectué des essais et a établi, à partir de 236 résultats, que les valeurs minimale et maximale qui peuvent être mesurées tout en étant significatives sur le plan statistique sont respectivement de 17 et de 83 % d'inhibition de la bioluminescence. Dans le même ouvrage, on fixe la limite de détection à 12 % d'inhibition.

La variabilité de l'essai Microtox est faible en comparaison de celle des autres essais de toxicité en milieu aquatique. Dans une série de 81 essais effectués avec un produit toxique de référence (le laurylsulfate de sodium), le coefficient de variation global a été de 18 % (Bulich *et al.*, 1981)[9]. Pour chacun des trois lots de bactéries employés lors de ces essais, les coefficients de variation individuels se situaient entre 6 et 10 %. Bien que les essais aient été exécutés par trois personnes avec trois photomètres différents, on n'a pas observé de différences importantes dans les résultats. Dans une autre étude, pour une série d'essais répétés, l'écart moyen absolu des CI_{50} pour huit produits chimiques organiques a été de 10 % (Curtis *et al.*, 1982). Trois laboratoires ont effectué, pour l'Association pétrolière du Canada, des essais qui ont donné un coefficient de variation moyen de 11 % (Strosher, 1984). Munkittrick et Power

---

8 Dans tous les documents provenant de Microbics, dans la documentation scientifique américaine en général et, souvent, dans des ouvrages canadiens, la CI_{50} est appelée à tort CE_{50} (*cf.* Glossaire). À l'avenir, il est certain que cette erreur sera corrigée, puisque l'ASTM (*American Society for Testing and Materials*) reconnaît l'exactitude du terme CI et en préconise l'utilisation pour les essais appropriés.

9 C. Bastien, du ministère de l'Environnement du Québec, a obtenu des coefficients de variation similaires (de 15 à 20 %) au cours d'essais effectués avec ce même produit toxique de référence sur une période de quatre ans.

(1989) résument ces comparaisons et d'autres en établissant une liste de coefficients de variation moyens qui vont de 2 à 30 %, sauf dans le cas des essais avec des métaux, où le coefficient moyen est de 60 %.

3.1.2 Interférence et autres limitations

La couleur vive d'un échantillon, particulièrement le rouge ou le brun, peut faire obstacle à la transmission de la lumière et, ainsi, aux mesures de la toxicité. Ce facteur pourrait être important dans le cas de certains effluents, par exemple ceux des usines de pâte à papier. On peut alors effectuer un calcul de correction photométrique après un essai complémentaire exécuté avec la cuvette de correction photométrique (*Colour Correction Cuvette*), comme le prévoit la sous-section 4.9.

La turbidité résultant de la présence de matières en suspension peut également réduire la transmission de la lumière et augmenter les mesures de la toxicité. La méthode de correction photométrique mentionnée ci-dessus peut être utilisée dans le cas de particules sombres qui absorbent la lumière, mais elle est inefficace dans le cas de particules blanches qui la reflètent. La centrifugation permet parfois de régler le problème de la turbidité (*cf.* 4.1.1). La concentration la plus forte d'échantillon qu'on analyse avec la technique Microtox normale est de 45 % (*cf.* 4.2.2). Si l'échantillon est peu toxique, un analyste pourrait vouloir effectuer l'essai avec un échantillon non dilué ou presque. On peut le faire à l'aide de la technique spéciale décrite à la division 4.8.3.

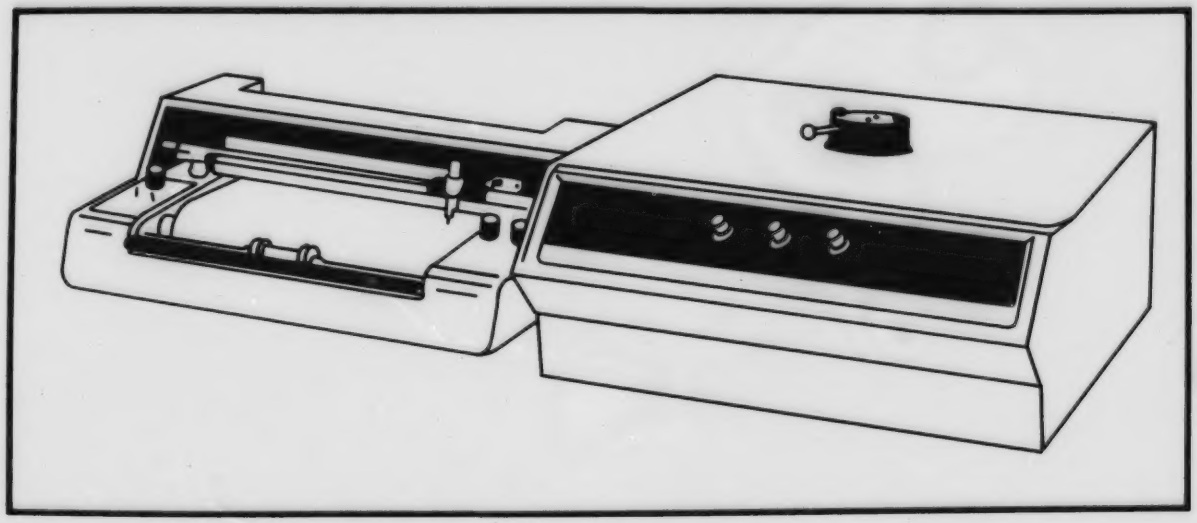
Les durées d'exposition sont quelque peu arbitraires, comme dans tous les essais de toxicité, et l'on doit juger des temps appropriés. La plupart des essais Microtox se font en 15 min. L'action du phénol est complète après 5 min; la meilleure mesure de sa toxicité est donc la CI_{50} après 5 min d'exposition. Dans le cas des métaux bivalents, la bioluminescence peut continuer à décroître après 15 min, de sorte que la meilleure mesure de la toxicité serait la CI_{50} après 30 min d'exposition ou plus. Pour les échantillons dont on ne connaît pas les constituants toxiques, il faudrait donc prendre des mesures après plusieurs durées d'exposition normales, puis retenir celle qui convient le mieux. La meilleure durée d'exposition serait celle qui se termine lorsque l'inhibition de la bioluminescence se stabilise, ou immédiatement après, c'est-à-dire celle qui ne laisse à la substance toxique que le temps nécessaire pour exercer son action au maximum.

3.2 Appareillage

On peut exécuter cet essai dans un laboratoire ordinaire, propre, sous un éclairage normal. Il ne faudrait prévoir des installations spéciales qu'en fonction du degré de danger lié aux échantillons ou aux produits chimiques à expérimenter ou du risque de contamination des échantillons.

3.2.1 Photomètre

On pourrait mesurer la bioluminescence à l'aide de divers photomètres, dont un photomètre standard relié à un bain-marie (Dearborn, 1986) ou un photomètre à ATP comme celui qui a été évalué par Awong *et al.* (1989). Les analyseurs de toxicité de Microbics (*Microbics Toxicity Analyzers*) des modèles 2055 et 500 sont toutefois bien conçus pour exécuter les essais avec diligence dans des conditions contrôlées. On décrit ci-après le mode d'emploi de ces appareils, qui sont illustrés à la figure 2 de la page 10 (modèle 2055) et à la figure 4 de la page 37 (modèle 500). La section 4 décrit des méthodes générales ainsi que les



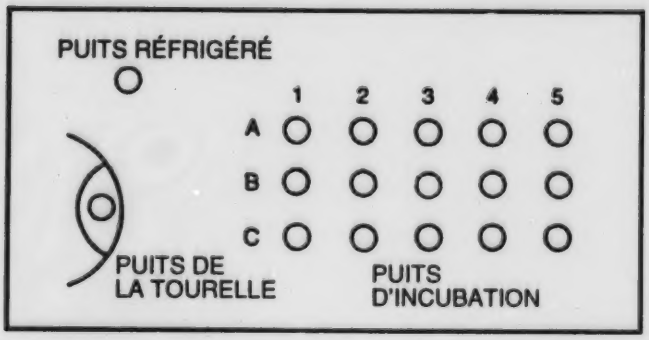


Figure 2 **Aspect de l'analyseur de toxicité de Microbics (*Microbics Toxicity Analyzer*) de modèle 2055 et de l'enregistreur graphique**

En haut de la figure, on peut voir l'analyseur de toxicité, à droite, avec sa «tourelle» qui dépasse du dessus de l'appareil et, à gauche, un enregistreur graphique. En bas, on trouve un schéma de la surface supérieure de l'analyseur, où se trouvent les puits destinés à recevoir les cuvettes d'essai.

méthodes particulières qui s'appliquent au modèle 2055. Étant donné que bien des opérations sont manuelles dans le cas de ce modèle, la section 4 vise à informer l'utilisateur des diverses étapes de l'analyse. Dans le cas du nouveau modèle 500, beaucoup d'opérations sont automatiques; les méthodes qui lui sont applicables sont décrites dans la section 5.

Avec l'analyseur de toxicité de modèle 2055, on mesure la bioluminescence des bactéries au moyen d'un photomultiplicateur à deux niveaux : 1X (pas de multiplication) et 10X (multiplication par 10). L'analyseur est plus qu'un photomètre, puisqu'il contient toutes les cuvettes nécessaires pour un essai et qu'il maintient leur contenu à une température présélectionnée. Des circuits sont intégrés de façon à permettre des mesures de la température dans les parties de l'appareil qui contiennent les solutions d'essai et les bactéries.

On trouvera, au bas de la figure 2, un schéma de la surface de travail de l'analyseur de modèle 2055, que tout analyste doit bien connaître. Les 15 cercles numérotés de A1 à C5 représentent les puits d'incubation, où l'on peut incuber les cuvettes contenant les échantillons et les témoins à 15 ± 0,3 °C. Le puits réfrigéré (*Precooling Well*) maintient la solution de reconstitution (*Reconstitution Solution*) et le réactif bactérien à une température de 3 à 5 °C. Le puits de la tourelle (*Turret Well*) est l'endroit où se fait la mesure de la bioluminescence; on doit y placer les cuvettes à tour de rôle.

3.2.2 Autre matériel

Le matériel nécessaire à l'exécution de ces essais comprend également :

a) Un **congélateur** ou un **réfrigérateur** pour l'entreposage des réactifs. Le congélateur devrait pouvoir conserver son contenu à -20 °C, et le réfrigérateur à une température se situant entre 2 et 8 °C. On ne devrait pas choisir des appareils à dégivrage automatique.

b) Un **pH-mètre**.

c) Un **compteur à rebours** ou un **chronomètre**. (L'enregistreur graphique peut également servir de compteur; c'est un procédé plus facile et une méthode plus sûre.)

d) Un **enregistreur graphique** ou un **système d'enregistrement sur ordinateur**. On peut relever les valeurs de la bioluminescence directement sur l'analyseur de toxicité et les noter, mais il est avantageux d'utiliser un enregistreur. Un modèle de 25 cm, monoplume et à levier manuel conviendrait parfaitement[10]. La version 6.0 du logiciel de Microbics permet d'enregistrer les données directement à l'aide d'un ordinateur personnel. Le logiciel et l'ordinateur remplacent l'enregistreur dans le cas du nouvel analyseur de modèle 500 (*cf.* section 5) et dans le cas des analyseurs de modèle 2055 qui sont pourvus de l'interface nécessaire.

e) Une **calculatrice** ou un **ordinateur**. Les résultats des essais peuvent être traités avec commodité en BASIC ou sur un

---

10 Microbics offre un enregistreur graphique compatible, le n° 686008; auparavant, la société recommandait l'enregistreur Beckman de modèle 2055 comme appareil complémentaire pour son analyseur de modèle 2055.

ordinateur personnel compatible IBM; on peut se procurer le logiciel requis chez Microbics. Il est également possible de traiter les données avec une calculatrice programmable Sharp de modèle EL-5150; toutefois, cet appareil est maintenant retiré du marché.

3.2.3 Fournitures

Les fournitures requises comprennent :

a) Des **récipients volumétriques en verre borosilicaté** (lavés à l'acide) pour le traitement des petits échantillons.

b) Des **cuvettes d'incubation jetables en verre**, mesurant 12 mm sur 50 mm. On les emploie comme contenants d'essai pour placer les diverses dilutions dans l'analyseur.

c) Une **cuvette de correction photométrique** ***(Colour Correction Cuvette)***. C'est une cuvette réutilisable, à double paroi, qui sert à la correction des valeurs de la bioluminescence dans le cas des échantillons colorés ou turbides.

d) Des **micropipetteurs** de 10, 200 ou 250, 500 et, au besoin, 50 et 1 000 L, à pointes jetables en plastique. On utilise également ces micropipetteurs pour mélanger les liquides dans les cuvettes, car ils permettent d'aspirer et de rejeter le liquide avec précision.

3.2.4 Organismes et réactifs

Les organismes et les réactifs nécessaires sont les suivants :

a) Une **réserve de réactif bactérien** (*Microtox Reagent* ou, plus récemment, *Bacterial Reagent*). On se procure les bactéries chez Microbics, dans de petits contenants scellés renfermant environ 100 millions d'organismes lyophilisés. On devrait les entreposer dans un congélateur, qui peut convenir pour au moins un an, ou dans un réfrigérateur, pour une durée indéterminée mais beaucoup plus courte. Lorsque les bactéries sont réactivées, Microbics les désigne par l'expression «réactif reconstitué» (*Reconstituted Reagent*).

b) Une **solution de reconstitution** ***(Reconstitution Solution ou Recon)***. Il s'agit d'eau distillée exempte de produits toxiques (Microbics, 1989b), qui est utilisée pour réactiver les bactéries au début d'un essai. On peut l'obtenir en contenants scellés chez Microbics. Il ne faut pas la congeler, mais on peut la conserver un an à une température de 2 à 8 °C, ou pour une durée indéterminée mais plus courte à la température de la pièce.

c) Un **diluant** ***(Diluent)***. Il sert à diluer les échantillons pour obtenir les concentrations désirées. On peut s'en procurer chez Microbics; il contient 2 % de chlorure de sodium dans de l'eau purifiée, et on peut l'entreposer dans les mêmes conditions que la solution de reconstitution. Pour les essais «en phase solide», on emploie un «diluant en phase solide» spécial (*Solid Phase Diluent*) (*cf.* 9.3.1).

d) Une **solution d'ajustement de la pression osmotique Microtox** ***(Microtox Osmotic Adjustment Solution (MOAS))***. C'est une solution de chlorure de sodium à 22 %, qui est utilisée pour amener la salinité des échantillons au niveau souhaité. On effectue généralement l'essai à une salinité de 2 %; on ajuste donc la salinité d'un échantillon d'eau douce en y ajoutant cette solution, à

raison d'une partie par 10 parties d'échantillon. Les exigences d'entreposage sont les mêmes que pour la solution de reconstitution.

e) Du **chlorure de sodium** (NaCl de qualité analytique, 99 %). On peut l'utiliser, au besoin, pour amener la salinité d'un échantillon à la valeur désirée aux fins de l'essai.

Section 4

Méthodes universelles

Les méthodes décrites dans la présente section ont été conçues pour l'analyseur Microtox de modèle 2055. Beaucoup de notions et de méthodes générales établies pour le modèle 2055 s'appliquent également au nouvel analyseur de modèle 500 mis sur le marché par Microbics au début de 1989. Les méthodes varient toutefois au niveau des détails, et beaucoup d'étapes sont automatisées dans le nouveau modèle (*cf.* section 5). Les méthodes de la présente section conviennent à tous les essais décrits dans les sections 6, 7, 8 et 9 pour des produits chimiques, des eaux usées et des sédiments ou des solides assimilés. Tous les aspects du système d'essai décrit dans la section précédente doivent leur être intégrés. La liste de contrôle sommaire des conditions et des méthodes d'essai recommandées que donne le tableau 1 ne présente pas seulement les méthodes universelles mais également celles qui sont conçues pour des types particuliers de substances à expérimenter.

On trouvera ci-après un bref résumé de la méthode. On soumet à l'essai une série de dilutions de l'échantillon et un ou plusieurs témoins. On mesure la bioluminescence dans les cuvettes de réactif bactérien reconstitué avant l'addition de l'échantillon (solution d'essai), puis après 5 et 15 min d'exposition, et parfois après 30 min ou plus si l'on se trouve en présence d'agents toxiques à action lente. On corrige les valeurs mesurées en fonction des changements survenus dans les témoins (composés de diluant non toxique), pour tenir compte de la dérive de la bioluminescence avec le temps et des faibles effets dus à la dilution du réactif bactérien au moment où l'on ajoute l'échantillon. On analyse la courbe dose-effet, et l'on estime mathématiquement la concentration qui provoque une inhibition de 50 % de la bioluminescence.

Le résumé qui suit est divisé en catégories et ne présente pas nécessairement l'ordre chronologique le plus efficace pour l'exécution des essais. Les guides de Microbics fournissent des instructions dans l'ordre chronologique.

4.1 Caractéristiques de l'échantillon causant de l'interférence

4.1.1 Couleur, turbidité et particules flottables

Il faut vérifier la couleur et la turbidité de l'échantillon à expérimenter, parce que ces deux facteurs peuvent modifier les mesures de la bioluminescence. Il est difficile de donner des valeurs numériques précises pour les niveaux critiques de facteurs variables comme ceux-ci, mais la technique facultative de correction photométrique de Microtox est assez simple à exécuter (*cf.* 4.9), et l'analyste devrait y recourir s'il a le moindre doute sur la transmission de la lumière.

Si la turbidité provoque une réflexion de la lumière, cette technique de correction photométrique ne convient pas. Il est préférable d'extraire les matières en suspension responsables de la turbidité, puis d'évaluer la toxicité résiduelle de la partie liquide de l'échantillon. Le filtrage pourrait être une technique satisfaisante, mais il faudrait vérifier le type de filtre à utiliser à l'aide d'un essai Microtox portant sur du

Tableau 1 Liste de contrôle des conditions et méthodes d'essai recommandées

MÉTHODES UNIVERSELLES	
Type d'essai	Statique, d'une durée de 5 ou 15 min, ou encore de 30 ou 60 min, au besoin.
Espèce	*Photobacterium phosphoreum*, souche NRRL B-11177.
Appareillage	Photomètre Microbics, de modèle 2055 ou de modèle 500 automatisé.
Eau de contrôle/ de dilution	Solution normalisée de 2 % de NaCl dans de l'eau pure (diluant); on peut aussi utiliser du sucrose au lieu du NaCl pour augmenter la sensibilité à l'ammoniac et à certains métaux.
Température	15 ± 0,3 °C
pH	Pas d'ajustement lorsque le pH de l'échantillon se situe entre 6,0 et 8,5; en dehors de cet intervalle, ajustement facultatif, selon le but visé.
Couleur, solides ou particules flottables	Correction photométrique en présence d'une couleur vive ou de particules foncées; retrait des solides pâles; dans le cas des particules flottables, exécution de l'essai sur le liquide sous-jacent.
Oxygène/aération	Habituellement, pas d'aération des échantillons ou des concentrations à expérimenter; si la teneur en oxygène dissous est inférieure à 40 % ou supérieure à 100 %, on peut opter pour une préaération de l'échantillon ou de toutes les solutions d'essai pendant au plus 20 min.
Préparation des solutions d'essai	La plus forte concentration est habituellement de 45 %, chaque concentration inférieure correspondant à la moitié de la précédente; on peut aussi exécuter des essais sur des échantillons non dilués ou presque ou sur d'autres concentrations en séries logarithmiques.
Observations	Bioluminescence au temps zéro, puis 5 et 15 min après l'introduction de l'échantillon; parfois, après 30 min ou plus d'exposition.
Résultats	CI_{50} après 5 et 15 min, et toute autre durée appropriée.
Produit toxique de référence	Choix de produits toxiques de référence, soumis à des essais mensuellement et sur chaque nouveau lot d'organismes; le phénol, le zinc, le bichromate de potassium et le laurylsulfate de sodium sont recommandés.
Validité de l'essai	Pour être valide, l'estimation numérique de la CI_p devrait se fonder sur des concentrations où l'on observe des valeurs d'inhibition de la bioluminescence supérieures et inférieures à la valeur à la CI_p.
PRODUITS CHIMIQUES	
Solvants	Seulement dans des cas spéciaux, tout comme les autres agents de solubilisation (p. ex., les dispersants).
Concentration	Mesure de la concentration dans la solution mère (souhaitable, mais non obligatoire).

Tableau 1 Liste de contrôle des conditions et méthodes d'essai recommandées (suite)

EFFLUENTS, LIXIVIATS ET ÉLUTRIATS	
Transport et stockage	Lorsque les échantillons sont chauds (plus de 7 °C), les ramener entre 1 et 7 °C sur de la glace ou des sacs réfrigérants. Les échantillons doivent être transportés dans l'obscurité entre 1 et 7 °C (de préférence à 4 ± 2 °C) et être stockés à 4 ± 2 °C; ils ne doivent pas geler. Les essais devraient commencer dans les 24 h et doivent commencer dans les 72 h suivant le prélèvement ou l'extraction.
Eau de contrôle/ de dilution	Diluant normal, comme dans les *MÉTHODES UNIVERSELLES*; on peut choisir de l'eau de mer non contaminée dans le cas des effluents rejetés en milieu marin ou des élutriats préparés au moyen d'eau de mer.
MILIEUX RÉCEPTEURS	
Transport et stockage	Comme pour les effluents, les lixiviats et les élutriats.
Eau de contrôle/ de dilution	Dans le cas d'eaux douces de surface, procéder comme dans les *MÉTHODES UNIVERSELLES*; dans le cas d'échantillons d'eau marine, ajuster la salinité du diluant ou utiliser de l'eau de mer non contaminée; dans le cas d'eaux estuariennes, amener la salinité du diluant à celle de l'échantillon, si celle-ci est supérieure à 2 %.
SÉDIMENTS OU AUTRES SOLIDES	
Transport et stockage	Mêmes températures que pour les effluents, les lixiviats et les élutriats; l'essai devrait commencer dans les deux semaines et doit commencer dans les six semaines suivant le prélèvement.
Préparation de la substance à expérimenter	Séparer l'eau de porosité des solides par centrifugation; si on le désire, effectuer un essai avec l'eau de porosité ou un extrait aqueux, comme dans le cas des effluents.
Sédiment de référence	Essai effectué en parallèle avec un sédiment non contaminé ayant des propriétés physico-chimiques semblables.
Appareillage	Photomètre de modèle 500, ou de modèle 2055 pourvu d'une interface avec un ordinateur.
Eau de contrôle/ de dilution	Diluant en phase solide (*Solid-Phase Diluent*) normalisé.
Observations	Comme dans les *MÉTHODES UNIVERSELLES*, sauf que la durée d'exposition est de 25 min et que la bioluminescence des bactéries exposées au sédiment de référence sert également de valeur au temps zéro pour toutes les concentrations.
Résultats	Comme dans les *MÉTHODES UNIVERSELLES*; on calcule la CI_{50} à l'aide du programme de Microbics relatif aux essais en phase solide.

diluant ayant passé dans le filtre. Selon Microbics (1988b), certains appareils ou papiers filtres peuvent augmenter la toxicité de façon mesurable, parfois en raison des agents mouillants ajoutés aux filtres. Un papier filtre pourrait également adsorber des substances toxiques, les retirant ainsi du filtrat de l'échantillon. On peut réduire la quantité de matières en suspension par centrifugation ou par quelques heures de décantation.

Il n'existe pas de méthode recommandée pour résoudre le problème des matières flottant à la surface de l'échantillon. Il n'est pas possible de placer des dispositifs de mélange dans les cuvettes, ou sur celles-ci, pendant l'essai. Toute tentative d'homogénéiser les liquides contenant des matières flottantes pendant toute la durée de l'essai pourrait provoquer la formation de gouttelettes en suspension qui nuiraient à la transmission de la lumière. Il incombe donc à l'analyste de juger de la technique à utiliser en fonction du type de matière en cause. On peut soit effectuer un essai avec le liquide sous-jacent, soit tenter d'homogénéiser la suspension, la première option étant recommandée.

4.1.2 pH

Les essais de toxicité devraient normalement se faire sans ajustement du pH[11]. Toutefois, on devrait mesurer le pH de l'échantillon avant l'exécution de l'essai. Il se peut que l'échantillon risque d'amener le pH d'une solution d'essai à une valeur se situant en dehors de l'intervalle de 6,0 à 8,5[12], ou que l'on souhaite évaluer des produits chimiques toxiques plutôt que l'effet du pH lui-même ou l'effet modificateur du pH sur la toxicité des substances présentes dans l'échantillon; on devrait alors ajuster le pH d'une aliquote

---

11 Une raison de ne pas modifier le pH de l'échantillon ou de la solution est que la valeur du pH peut influer fortement sur la toxicité de la substance à expérimenter, si l'on en juge par les résultats d'essais effectués sur des poissons et des invertébrés. La toxicité pourrait diminuer (p. ex., dans le cas de l'ammoniac, lorsqu'un pH alcalin devient neutre) ou augmenter (p. ex., dans le cas du zinc, où une eau acide ou alcaline est neutralisée). Pour les concentrations (généralement) faibles d'eaux usées qu'on trouve dans les milieux récepteurs après dilution, toute modification du pH causée par la substance à expérimenter (et toute modification concomitante de la toxicité) pourrait être acceptée comme partie intégrante de la pollution. C'est pourquoi on en arrive à la conclusion que le pH ne devrait pas être ajusté au cours des essais.

12 Microbics (1988a) indique qu'un pH se situant entre 6,3 et 7,8 ne provoque aucune diminution de la bioluminescence. Cet intervalle est élargi dans le présent rapport, pour deux raisons. Premièrement, Krebs (1983) présente un graphique où la variation de la bioluminescence ne dépasse pas 5 % dans tout l'intervalle de pH compris entre 5,5 et 9,0. Deuxièmement, *Photobacterium phosphoreum* est un organisme marin; or, dans les océans, le pH a une valeur moyenne de près de 8,1 (Thurman, 1975), il atteint fréquemment une valeur de 8,3, et l'intervalle normal est de 7,5 à 8,5, que l'eau soit saumâtre ou salée. Puisque les laboratoires d'Environnement Canada effectuent sans doute des essais sur des échantillons d'eau de mer qui ont reçu des eaux usées, il est nécessaire que la limite supérieure du pH pour l'exécution d'essais soit d'au moins 8,3, parce que cette valeur pourrait être une condition naturelle des échantillons. Aux fins du présent rapport, la limite supérieure a été fixée à une valeur légèrement plus élevée; l'intervalle recommandé de 6,0 à 8,5 a été choisi parce qu'il se situe, à 0,5 unité près, à l'intérieur de l'intervalle d'effet nul déterminé par Krebs (1983). On pourrait dans certains cas avoir des raisons d'ajuster le pH à l'intérieur de l'intervalle recommandé, dont les raisons d'ordre toxicologique exposées dans la présente section.

de l'échantillon avant de s'en servir[13]. On pourrait aussi faire un deuxième essai en parallèle, avec ajustement du pH.

Pour ce deuxième essai, le pH initial de l'échantillon pourrait, selon les objectifs de l'essai, être ramené à une valeur correspondant, à 0,5 unité près, au pH du diluant ou à celui de l'eau de mer naturelle. Selon une autre démarche admissible, on peut ramener le pH de l'échantillon à une valeur de 6,0 à 6,5 (s'il est inférieur à 6,0) ou de 8,0 à 8,5 (s'il est supérieur à 8,5)[14]. Des solutions d'acide chlorhydrique (HCl) ou d'hydroxyde de sodium (NaOH) de titre inférieur ou égal à 1 *N* devraient normalement être utilisées pour toutes les opérations d'ajustement du pH. Certaines situations (p. ex., des effluents à pouvoir tampon élevé) pourraient nécessiter l'utilisation de teneurs supérieures d'acide ou de base, pour éviter une modification considérable du volume de l'échantillon ajusté.

L'ajustement du pH peut provoquer la précipitation de solides dissous qui pourraient influer sur les mesures de la bioluminescence pendant les essais; il faudrait surveiller l'apparition de ces précipités et essayer de régler le problème au besoin (*cf.* 4.1.1).

Abernethy et Westlake (1989) fournissent des lignes directrices utiles pour l'ajustement du pH. Il faudrait laisser s'équilibrer, après chaque addition d'acide ou de base, les aliquotes d'échantillons faisant l'objet d'un ajustement du pH. Le délai nécessaire pour atteindre l'équilibre dépend du pouvoir tampon de l'échantillon. Pour les échantillons d'effluents, il est recommandé de prévoir une durée de 30 à 60 min pour l'ajustement du pH (Abernethy et Westlake, 1989).

Lorsqu'on effectue l'essai de toxicité pour mieux comprendre la nature des substances toxiques présentes dans un échantillon d'effluent, de lixiviat, d'élutriat ou de milieu récepteur, on utilise souvent l'ajustement du pH, en conjonction avec un certain nombre d'autres techniques (p. ex., l'oxydation, le filtrage, l'extraction à l'air et l'addition d'agents chélateurs), pour caractériser la toxicité de l'échantillon. Mount et Anderson-Carnahan (1988) comptent l'ajustement du pH parmi neuf techniques d'évaluation d'identification de la toxicité qui, lorsqu'on les applique à des échantillons

---

13 Le principe qui justifie un tel ajustement n'est pas en contradiction avec le raisonnement précédent selon lequel on accepte un pH divergent en tant que partie intégrante de la pollution, mais il s'appuie sur le but de l'essai. En effet, certains produits chimiques et eaux usées entraînent des niveaux de pH ayant des effets sublétaux ou létaux directs, particulièrement dans le cas d'essais de surveillance ou de conformité portant sur des effluents non dilués. Il semble peu probable qu'un analyste cherche essentiellement à savoir si un pH extrême est toxique, étant donné que ce pH pourrait n'être pas représentatif des conditions qu'on observerait après une dilution, même modérée, dans le milieu récepteur. Si le pH en soi présentait un intérêt prépondérant, on pourrait l'évaluer économiquement par des mesures physico-chimiques. L'analyste cherche souvent à savoir si des substances toxiques sont présentes dans les eaux usées et, pour ce faire, il faudrait éliminer tout masquage dû à une action létale du pH. Ce principe conduit à l'utilisation d'échantillons à pH ajusté, de la même façon qu'on normalise la température et la salinité à des niveaux favorables dans les essais de toxicité.

14 L'addition d'un acide ou d'une base à un échantillon d'effluent, de lixiviat ou d'élutriat non dilué peut altérer de façon significative l'ionisation de certaines substances toxiques (p. ex., l'ammoniac, les acides résiniques et le zinc) et détruire l'intégrité de l'échantillon à l'essai. Si l'on décide d'ajuster le pH, il faudrait le faire avec soin juste à l'intérieur des limites fixées (soit, dans le cas présent, de 6,0 à 8,5), ou obtenir une valeur correspondant, à 0,5 unité près, au pH du diluant ou de l'eau de mer. Il faudrait éviter les ajustements excessifs, particulièrement la neutralisation, qui consiste à augmenter ou à diminuer le pH jusqu'à une valeur de 7,0.

aqueux de toxicité aiguë, constituent une méthode utile pour déterminer la nature physico-chimique des substances toxiques et leur sensibilité à la détoxication.

4.1.3 Oxygène dissous et aération

Habituellement, on ne procède pas à l'aération des échantillons ou des solutions d'essai préparées. Ce traitement n'est pas considéré comme étant nécessaire pour l'essai Microtox[15], mais on peut décider de le faire[16]. Seulement lorsque la teneur en oxygène dissous mesurée dans l'échantillon ou dans une aliquote d'une solution d'essai, au moment de sa préparation, est inférieure à 40 % ou supérieure à 100 % de saturation en air, on pourrait aérer l'échantillon ou toutes les solutions[17] avant la mise en route de l'essai («préaération»). L'aération devrait être assurée par des bulles d'air comprimé exempt d'huile, produites au moyen d'une pipette en verre jetable; elle devrait se faire au débit minimal requis pour l'aération du récipient particulier et du volume de liquide en cause. La durée de la préaération devrait être limitée à 20 min ou, si cette durée est plus courte, au temps voulu pour obtenir 40 % de saturation en air dans l'échantillon ou dans la solution d'essai de la concentration la plus élevée (ou 100 % de saturation, s'il y avait sursaturation). Toute préaération doit être signalée dans le procès-verbal de l'essai (*cf.* section 10).

4.2 Préparation de l'essai

4.2.1 Préparation de l'analyseur de toxicité

a) S'assurer que les températures du puits de la tourelle (*Turret Well*) et de l'incubateur (*Incubator*) sont de $15 \pm 0{,}3$ °C. Si ce n'est pas le cas, les ajuster à l'aide du bouton de réglage de la température (*TEMP SET*).

b) Régler le photodétecteur à 10X (multiplication). Tourner le bouton de l'étendue (*SPAN*) au maximum.

c) S'assurer que l'interrupteur de haute tension (*HV*) est en marche. Il devrait l'être quelques minutes avant qu'on passe au point *d*).

d) Vérifier que le photodétecteur indique bien 000 et que le voyant du signe «moins» clignote. Dans le cas contraire, l'ajuster à 000 à l'aide du bouton *ZERO*.

e) Exécuter un contrôle d'étalonnage. Régler l'étendue (*SPAN*) à 4, puis appuyer sur le

---

15 Plusieurs laboratoires canadiens notent, tout comme Microbics, qu'une faible teneur en oxygène, du moment qu'elle est d'au moins 1 mg/L, ne semble pas influer sur les résultats de l'essai Microtox. On pense généralement qu'une manipulation normale des échantillons et une dilution ordinaire de moitié avec des solutions aérées fournissent suffisamment d'oxygène pour l'essai, même si l'échantillon n'en contient pas assez.

16 Beaucoup des méthodes d'essai biologique publiées par Environnement Canada (p. ex., 1990a, 1990b, 1990c, 1992a, 1992b) exigent une aération s'il y a carence ou sursaturation en oxygène, et l'option offerte ici est semblable à la méthode exigée pour ces essais. Cette option permet à un laboratoire d'exécuter, s'il le souhaite, un essai Microtox à l'aide de techniques aussi semblables que possible à celles qui sont employées dans d'autres essais. Par exemple, l'aération peut éliminer des produits chimiques volatils d'une solution ou augmenter leur taux d'oxydation et de dégradation, ce qui modifierait la toxicité de la solution. Si l'on procédait ainsi pour un essai sur la truite arc-en-ciel, par exemple, un analyste pourrait souhaiter exécuter un essai Microtox de la même manière. Par ailleurs, on pourrait faire deux essais Microtox, avec et sans préaération, pour déterminer l'effet de ce traitement.

17 Dans l'essai Microtox, il n'y aurait habituellement qu'une seule solution d'essai que l'on pourrait aérer, et ce serait celle de la concentration la plus élevée, ou l'échantillon lui-même. Les concentrations inférieures seraient obtenues par dilution dans les cuvettes.

bouton *CAL CHECK*, qui allume une minuscule lumière normalisée dans le puits de la tourelle. L'appareil devrait afficher une valeur entre 80 et 120; si c'est le cas, commencer l'essai en laissant les boutons dans la même position.

f) Mettre l'enregistreur en marche et ajuster la vitesse de défilement du papier à 1 cm/min. Ajuster la plume à zéro et vérifier que le photomultiplicateur de l'analyseur de toxicité indique toujours 000. On peut alors fermer l'enregistreur jusqu'au moment approprié.

g) Mettre de nouvelles cuvettes dans chaque puits qui sera utilisé. Tous les puits devraient contenir des cuvettes; on peut laisser dans leur puits les cuvettes qui ont été employées lors d'un essai précédent et ne servent pas pour l'essai en cours.

h) Si l'une des indications de l'appareil n'est pas comprise dans l'intervalle prévu ci-dessus, consulter le guide Microtox pour prendre une mesure corrective.

4.2.2 Préparation des solutions d'essai

La plupart des contenants et des outils de mesure utilisés pendant les essais (p. ex., les cuvettes et les pointes en plastique des micropipetteurs) sont jetables, et l'on présume qu'ils sont propres et prêts à l'emploi au moment où on les obtient. On pourrait avoir besoin d'autres dispositifs de mesure, d'agitateurs, etc. pour la manipulation de l'échantillon, et l'on doit les nettoyer et les rincer à fond conformément aux modes opératoires normalisés. Comme on sait que le lavage de la verrerie augmente la toxicité dans l'essai Microtox, il faut rincer à fond; on recommande également d'effectuer une vérification directe des effets de chaque technique de lavage sur les résultats de l'essai.

Dans le cas des essais d'estimation de la CI_{50}, on doit préparer au moins quatre concentrations et un contrôle ou témoin (100 % de diluant). Ces quatre concentrations représentent le nombre minimal que l'on doit utiliser pour obtenir une relation dose-effet adéquate, surtout si le degré général de toxicité de l'échantillon est inconnu. Le BNQ (1987) recommande cinq concentrations. Comme pratique courante, on aurait généralement avantage à utiliser une série appropriée de six concentrations, qui pourraient facilement être placées dans les puits d'incubation de l'analyseur standard. On utilise généralement six concentrations et un contrôle dans les laboratoires canadiens, et c'est ce que nous recommandons. Comme dans les autres essais de toxicité, les séries de concentrations normalisées suivent une progression géométrique ou logarithmique; dans ce dernier cas, chaque concentration correspond à la moitié de la précédente, la concentration la plus élevée étant de 45 %, soit la plus forte que l'on puisse utiliser avec la technique de base. On décrit ci-dessous la méthode standard de Microbics, qui utilise quatre concentrations.

D'autres séries de concentrations pourraient mieux convenir à certains genres d'échantillons et l'on encourage leur utilisation, sans égard aux instructions standard données ci-dessous pour quatre concentrations. Comme variation la plus simple, on pourrait facilement ajouter des concentrations plus faibles à une série de dilutions de moitié, en suivant exactement la même méthode de dilution et en plaçant les cuvettes additionnelles dans les puits de la rangée C. Par ailleurs, dans le cas d'échantillons dont la toxicité est faible ou moyenne, on trouve, dans certains laboratoires, qu'une série de six concentrations plus rapprochées

s'échelonnant de 18 à 45 % est utile pour les essais courants[18].

Voici les étapes de la préparation des solutions d'essai :

a) À l'aide d'un micropipetteur, déposer 1 000 µL (1,0 mL) de solution de reconstitution dans la cuvette du puits réfrigéré (*Precooling Well*). (On prépare ainsi la reconstitution subséquente d'une fiole de réactif bactérien (*cf.* 4.3.1) en permettant à la solution de reconstitution d'atteindre la température désirée pendant les étapes suivantes.)

b) Introduire du diluant dans les cuvettes. Pipetter 1 000 µL de diluant dans la cuvette du puits A1 (qui contiendra le témoin) et dans les cuvettes des puits A2, A3 et A4 (qui contiendront les dilutions de l'échantillon). Pipetter 500 µL de diluant dans chacune des cinq cuvettes de la rangée B.

c) Préparer l'échantillon d'une concentration (possible[19]) de 45 % dans la cuvette A5 en y ajoutant 200 µL de solution *MOAS*, puis 2 000 µL (2,0 mL) d'échantillon. Mélanger en aspirant cinq fois du liquide dans le micropipetteur de 500 µL utilisé pour l'addition d'échantillon, puis en le remettant dans la cuvette. Jeter 200 µL du liquide.

d) Préparer les dilutions dans les cuvettes A2 à A4. Transférer 1 000 µL de la cuvette A5 à la cuvette A4, puis mélanger avec le micropipetteur. Transférer ensuite 1 000 µL de A4 à A3, puis de A3 à A2, en utilisant la même technique. Après avoir mélangé le contenu de la cuvette A2, jeter 1 000 µL de liquide de façon à obtenir le même volume (1,0 mL) que dans la cuvette A1 et les cuvettes A3 à A5; on assure ainsi un traitement parallèle des concentrations, y compris la stabilisation de la température dans les puits. Attendre encore 5 min pour permettre au contenu des cuvettes d'atteindre la bonne température.

---

18 Cette suggestion vient de M. R. Salahub, d'Edmonton (Alberta). Par exemple, on pourrait obtenir une série de concentrations presque logarithmique (valeurs de 18, 22,5, 27, 31,5, 38,25 et 45 %) de la façon suivante : *a*) ajuster au niveau requis la salinité d'une aliquote d'échantillon en y ajoutant de la solution *MOAS*; *b*) déposer dans les cuvettes de la rangée A des volumes de 0,80, 1,0, 1,2, 1,4, 1,7, et 2,0 mL de cet échantillon ajusté; *c*) porter les volumes dans ces cuvettes à 2,0 mL avec du diluant; *d*) suivre la méthode standard de transfert dans les cuvettes de la rangée B. À noter que les anciennes versions du logiciel conçu pour l'analyseur de modèle 500 étaient limitées à des dilutions de moitié; cette restriction n'existe plus dans la nouvelle version 6.0 (*cf.* 5.2).

19 Dans la documentation et les anciens guides, on affirme que la concentration maximale serait de 45,45 %, mais ce n'est pas exact dans le cas de la méthode standard. L'échantillon a une concentration initiale de 90,91 % dans la cuvette A5. On le dilue de moitié dans la cuvette A4, ce qui donne un échantillon à 45,45 %, mais ce dernier n'est pas utilisé pour l'essai. Voici un exemple de calcul avec la concentration la plus forte : on ajoute 0,5 mL d'échantillon à 90,91 % provenant de la cuvette A5 à 0,5 mL de diluant et à 0,01 mL de réactif dans la cuvette B5. Dès ce moment, l'essai de toxicité commence et la concentration dans la cuvette B5 est la suivante :

$$90{,}91\ \% \cdot 0{,}5/(0{,}5 + 0{,}5 + 0{,}01) = 45{,}004\ \%$$

Les concentrations plus faibles obtenues ensuite sont des dilutions de moitié à partir de cette concentration, et ce sont les valeurs que l'on utilise dans le présent rapport.

4.3 Mise en route de l'essai

4.3.1 Reconstitution du réactif bactérien[20]

a) Prendre une fiole de réactif bactérien dans le congélateur. Procéder immédiatement à la reconstitution en mélangeant bien les bactéries lyophilisées avec la solution de reconstitution provenant du puits réfrigéré : il faut retourner rapidement la cuvette de solution de reconstitution et en verser vite le contenu dans la fiole de réactif, car une addition lente peut provoquer la lyse des bactéries. Faire tournoyer rapidement la fiole trois ou quatre fois, puis en verser le contenu dans la cuvette qui contenait la solution de reconstitution et placer cette cuvette dans le puits réfrigéré. Mélanger à nouveau son contenu en l'aspirant à l'aide d'une pipette propre de 500 µL, puis en le remettant dans la cuvette; répéter 20 fois cette opération. Le réactif reconstitué qui se trouve maintenant dans la cuvette du puits réfrigéré suffit en théorie à l'exécution de 20 essais standard. La bioluminescence devrait demeurer forte pendant 2 h. Si l'on prévoit d'utiliser le réactif plus longtemps, il est conseillé d'inclure un produit toxique de référence dans l'essai et de surveiller tout indice d'une diminution de la bioluminescence[21].

b) Placer le réactif bactérien dilué dans les cuvettes de la rangée B. Ajouter 10 µL du réactif reconstitué (environ un million de bactéries) dans chacune des cinq cuvettes de la rangée B, qui contiennent déjà du diluant. (L'addition des bactéries doit se faire sous la surface du

---

20 On gagne habituellement du temps en reconstituant le réactif bactérien au début des préparatifs et en apprêtant les solutions à expérimenter selon les instructions de la division 4.2.2 pendant la période d'attente de 15 min (point 4.3.1 *c*)).

21 Le réactif bactérien reconstitué continue à émettre de la lumière pendant quelques heures. La période maximale d'utilisation des bactéries est variable. Dans Beckman (1982), on affirme que «l'intensité et la stabilité de la bioluminescence du réactif Microtox demeureront satisfaisantes plusieurs heures après la reconstitution». On précise également que le mélange des bactéries dans les cuvettes (*cf.* 4.3.1 *b*)) «devrait commencer dans les 5 min qui suivent la reconstitution», parce que la sensibilité des bactéries à certaines substances toxiques pourrait changer avec le temps écoulé après la reconstitution. Dans des documents récents, on mentionne que «la sensibilité du réactif demeure essentiellement la même pour une période de 2 h après la reconstitution» (Microbics, 1989b), ou «pendant 1 à 2 h après la reconstitution», avec une surveillance de la sensibilité pour toute utilisation d'une durée supérieure, au moyen d'un essai normalisé avec du phénol (Microbics, 1991b). Qureshi *et al.* (1983) indiquent que les essais devraient commencer dans l'heure qui suit la reconstitution; ils ont constaté que la sensibilité augmente après cette période, à mesure que la bioluminescence diminue.

Lorsqu'on utilise l'analyseur de toxicité de modèle 2055, on peut estimer la viabilité du réactif nouvellement reconstitué par une mesure de la bioluminescence 10 min après la reconstitution; on devrait obtenir un valeur de 80 ou plus, lorsque la sensibilité est réglée à 1X et que l'étendue (*SPAN*) est réglée au maximum (Microbics, 1988a). Les guides n'indiquent pas si l'on peut se servir du même critère pour déterminer le moment où le réactif reconstitué n'est plus utilisable.

Des utilisateurs de l'essai Microtox ont indiqué que l'on peut employer le réactif pendant 4 à 6 h, à condition de contrôler adéquatement (de façon périodique) la performance et les résultats. Certains utilisateurs analysent les échantillons en double, incluent un produit toxique de référence dans chaque essai, ou ont recours à ces deux méthodes à la fois. Les analystes qui utilisent l'analyseur de toxicité de modèle 2055 devraient également surveiller les changements dans le réglage de l'étendue (*SPAN*) au début de l'essai, le degré d'ajustement du *SPAN* nécessaire entre les essais, et les rapports des témoins. Il est recommandé de prendre ces précautions, et surtout d'effectuer les essais avec un produit toxique de référence, si le réactif bactérien reconstitué est utilisé après une période de 2 h.

diluant, comme le prévoient les principaux guides Microtox.)

c) Attendre 15 min pour que la bioluminescence atteigne une valeur relativement stable (décroissant lentement).

4.3.2 Mesures au temps zéro

On doit mesurer la bioluminescence au temps zéro dans les cuvettes de la rangée B avant d'y ajouter l'échantillon. On mélange ensuite les bactéries et l'échantillon, et l'essai de toxicité débute.

a) Fermer la tourelle et mettre l'enregistreur graphique en marche. Placer la cuvette B1 dans le puits de la tourelle et procéder à la mesure de la bioluminescence, en ajustant la sensibilité de l'analyseur de toxicité de façon à obtenir une valeur se situant entre 80 et 90.

b) Indiquer le temps zéro sur le papier graphique en appuyant sur le bouton *CAL CHECK* de l'analyseur de toxicité. Mesurer immédiatement la bioluminescence au temps zéro dans les cuvettes B1 à B5, en les plaçant à tour de rôle dans le puits de la tourelle. Microbics désigne ces mesures par «I_0», ce qui signifie «bioluminescence au temps zéro». Les valeurs obtenues devraient se situer entre 80 et 100.

c) Mélanger immédiatement 500 µL provenant de chacune des cuvettes de la rangée A au contenu de la cuvette correspondante de la rangée B, c'est-à-dire de A1 à B1, de A2 à B2, etc. (Cette étape marque le début officiel de l'essai de toxicité. On laisse reposer les cuvettes jusqu'aux mesures photométriques après 5 min, 15 min, etc.) Suivre l'ordre croissant de concentration indiqué ci-dessus afin de pouvoir utiliser la même pointe pour le micropipetteur. Les concentrations exactes d'échantillon dans les cuvettes de la rangée B sont maintenant les suivantes, et l'on devrait les consigner au procès-verbal de l'essai.

B1 = 0,0 % (Contrôle ou témoin)
B2 = 5,63 %
B3 = 11,3 %
B4 = 22,5 %
B5 = 45,0 %

4.4 Observations et mesures

On devrait mesurer la bioluminescence dans chacune des cuvettes B1 à B5, 5,0 min après l'addition du liquide provenant de la cuvette correspondante de la rangée A. Procéder pour les cuvettes de la rangée B de la même manière que pour les mesures au temps zéro, et dans l'ordre où l'on a fait le mélange entre les cuvettes des rangées A et B (*cf.* 4.3.2). Il faudrait prendre soin d'effectuer la mesure pour chaque cuvette exactement **5 min** après qu'elle a reçu le liquide provenant de la rangée A. Il ne doit se glisser aucune erreur séquentielle dans les durées d'exposition due à l'exécution plus rapide ou plus lente des opérations après 5 min, par rapport à la vitesse au moment du mélange. Microbics désigne par «I_5» les valeurs de la bioluminescence après 5 min.

Répéter les mesures après 15 min d'exposition totale.

Des substances toxiques à action lente, par exemple des métaux bivalents, pourraient être présentes dans les échantillons dont la toxicité est inconnue. Souvent, il est souhaitable de prendre une autre mesure après 30 min d'exposition; parfois, il

pourrait aussi s'avérer utile d'en prendre d'autres après 45 ou 60 min. En analysant les séries de mesures, l'analyste peut déterminer : *a*) si la bioluminescence diminue encore de façon significative (soit de plus de 10 % depuis la dernière mesure), auquel cas on devrait poursuivre l'exposition jusqu'à une nouvelle mesure; ou *b*) si la diminution s'est interrompue, auquel cas on peut mettre fin à l'essai. Le but est de laisser à l'échantillon assez de temps pour que son effet inhibiteur atteigne un niveau maximal, sans poursuivre l'exposition plus longtemps que nécessaire une fois que l'on a atteint le «plateau» au-delà duquel il n'y a plus d'inhibition additionnelle appréciable. Étant donné que les valeurs mesurées pour le témoin (et pour les concentrations à expérimenter) diminuent graduellement avec le temps, il faut en tenir compte lorsque l'on évalue les diminutions dans les cuvettes d'échantillon, et la meilleure manière de le faire est la méthode statistique de calcul de la valeur de γ décrite dans la sous-section 4.5. De toute manière, il n'est pas souhaitable de prolonger l'exposition sans nécessité, et *la CI_{50} après 15 min devrait être considérée comme étant le résultat normal.* Dans des cas spéciaux, les bactéries pourraient récupérer et la bioluminescence augmenter après une exposition plus longue; on devrait alors utiliser les premières données.

Si l'échantillon est plus toxique que prévu ou s'il l'est moins, il se pourrait que toutes les concentrations inhibent la bioluminescence de plus de 50 % ou de moins de 50 %. Dans les deux cas, il faudrait reprendre l'essai avec des concentrations plus appropriées.

4.5 Résultats et calculs

On doit consigner les mesures de la bioluminescence. Si l'on utilise un enregistreur graphique à cette fin, on peut en extraire les valeurs ultérieurement. L'annexe C contient un exemple de formulaire d'enregistrement des données, et la section 10 présente la liste des points à inscrire au procès-verbal.

Le résultat est la concentration à laquelle on observe 50 % d'inhibition de la bioluminescence, c'est-à-dire la CI_{50}. Pour estimer la CI_{50} après 5 min, on doit effectuer les calculs exposés ci-après. On suivrait les mêmes étapes pour calculer les valeurs de la CI_{50} après 15 ou 30 min.

a) *Calculer le rapport du témoin*, c'est-à-dire la proportion de la bioluminescence initiale qui reste dans le témoin après un temps donné. On ne fait cette mesure, et le calcul du rapport correspondant, qu'avec la cuvette B1, soit la cuvette du contrôle ou du témoin.

Il se produit naturellement une légère diminution de la bioluminescence au cours de l'essai. On doit tenir compte de ce facteur dans l'évaluation de la perte de lumière due à la toxicité. Le rapport du témoin permet de faire cette correction.

Rapport du témoin $R_5 = I_5 / I_0$

où : I_0 = lumière émise par le témoin au temps zéro
I_5 = lumière émise par le témoin après 5 min

b) *Calculer la valeur de* γ (gamma), c'est-à-dire la mesure de la perte de luminescence qu'on utilise dans le calcul de la CI_{50}. Elle est calculée séparément pour chaque cuvette qui contient une quantité de l'échantillon à expérimenter.

Plus précisément, la valeur de γ d'une cuvette donnée après une durée

d'exposition particulière est le rapport entre la quantité de lumière perdue à cause de la toxicité et la lumière restante à ce moment[22].

$$\gamma = (\text{lumière perdue})/(\text{lumière restante}) = [(R_5 \cdot I_0) - I_5]/I_5 = [(R_5 \cdot I_0)/I_5] - 1$$

où : I_0 = lumière émise au temps zéro
I_5 = lumière émise après 5 min
R_5 = rapport du témoin

Une valeur de γ égale à l'unité (1) indique qu'il y a eu perte de la moitié de la production de lumière à cause de la toxicité, ce qui correspond à la CI_{50}.

4.5.1 Estimation de la CI_{50} à l'aide d'un graphique

Les valeurs de γ sont inscrites sur l'axe vertical d'un papier logarithmique, les concentrations correspondantes de l'échantillon étant portées sur l'axe horizontal (Microbics, 1992). Après avoir tracé une ligne ajustée à l'oeil, on détermine la CI_{50}, qui est la concentration correspondant à une valeur de γ égale à 1,0 (*cf.* figure 3).

La CI_{50} devrait être une mesure d'interpolation, c'est-à-dire qu'il faudrait observer au moins une concentration causant plus de 50 % d'inhibition de la bioluminescence (soit une concentration supérieure à la CI_{50}), et au moins une concentration causant moins de 50 % d'inhibition. La division 4.8.5 contient plus de détails sur la nécessité de faire une interpolation et sur l'utilisation de résultats tels que la CI_{20} au lieu de la CI_{50}.

L'exactitude de cette méthode repose sur l'habileté de l'analyste à ajuster une ligne à l'oeil. C'est pourquoi il est habituellement souhaitable de prendre une méthode qui utilise un ordinateur ou une calculatrice comme méthode principale d'estimation de la CI_{50} (*cf.* 4.5.2). Néanmoins, on devrait intégrer systématiquement une analyse graphique à chaque essai, pour vérifier la vraisemblance de la CI_{50} calculée. La préparation d'un graphique est particulièrement utile pour détecter, dans les données, des anomalies qui pourraient inciter à faire une étude plus poussée ou diminuer la fiabilité des résultats. Tout écart important entre la CI_{50} calculée et celle que l'on obtient d'après le graphique devrait être résolu.

Si l'on a saisi manuellement les données dans un ordinateur, l'établissement d'un graphique à la main est également utile pour le repérage de données incorrectes, car toute erreur pourrait passer inaperçue autrement. Le logiciel de Microbics peut afficher les données intermédiaires et produire un graphique pratique, sur demande. Si l'on se sert de données saisies manuellement pour créer un graphique sur ordinateur, on devrait vérifier les points de données par rapport aux valeurs observées, pour éviter les erreurs de saisie et les évaluations anomales de la CI_{50}. De telles erreurs pourraient être repérées par une vérification au moyen d'un graphique tracé manuellement.

---

22 La valeur de γ représente la proportion de la lumière perdue par rapport à la lumière restante. On peut utiliser une mesure plus simple, comme la quantité absolue de lumière perdue à cause de la toxicité, mais on obtient généralement une meilleure relation linéaire en traçant un graphique du logarithme de γ par rapport au logarithme de la concentration. La valeur de γ est donc préférable pour décrire la courbe dose-effet et estimer la CI_{50} ainsi que les limites de confiance. On trouvera dans Beckman (1982) un exemple où les deux méthodes sont comparées.

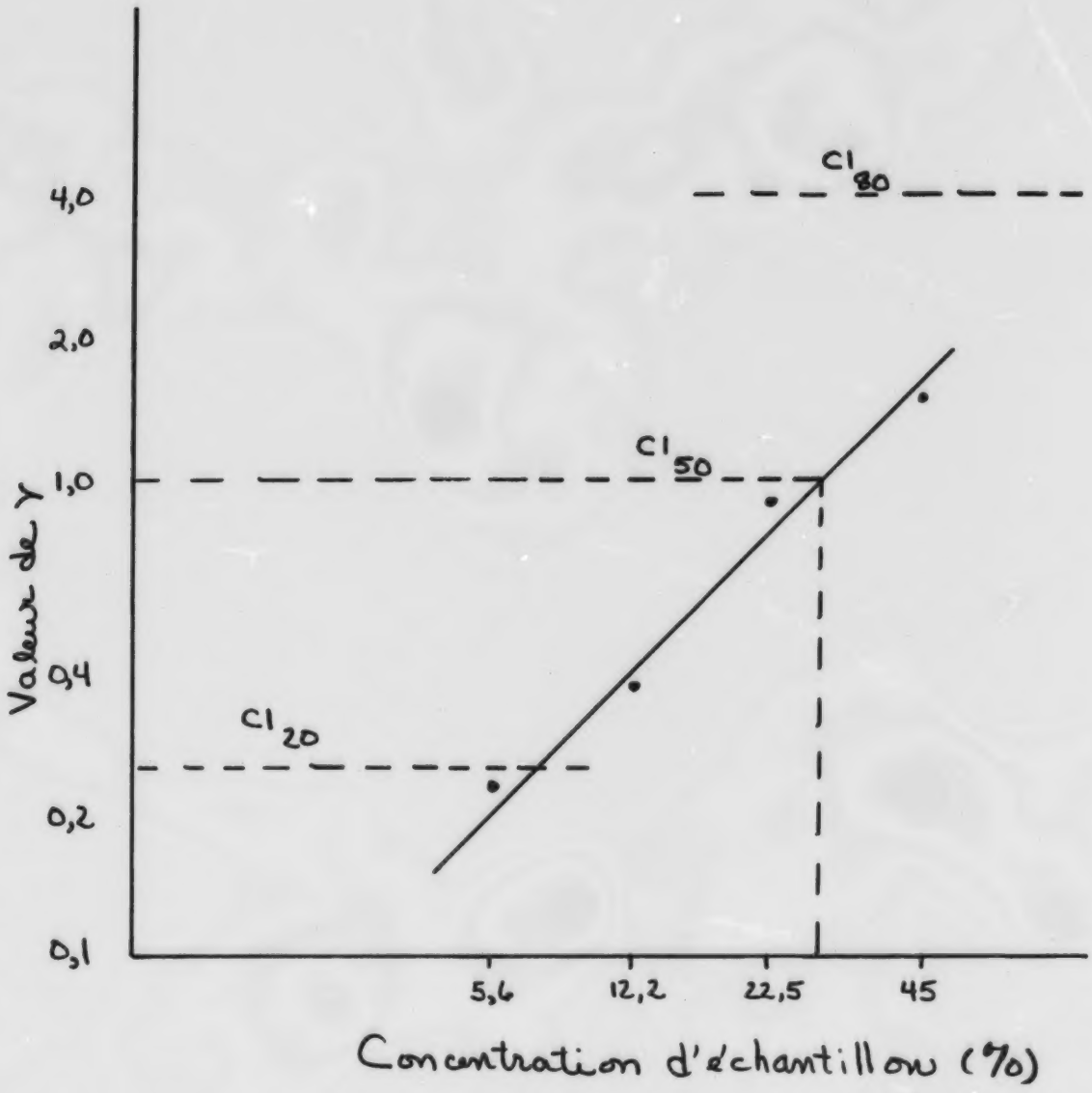


Figure 3 **Exemple d'estimation de la CI_{50} à l'aide d'un graphique tracé à la main sur du papier logarithmique**

On peut déterminer sur le graphique la concentration qui cause 50 % d'inhibition de la bioluminescence de la bactérie *Photobacterium phosphoreum*. L'exemple hypothétique ci-dessus porte sur quatre concentrations. On peut déterminer la concentration qui causerait 50 % d'inhibition en partant d'une valeur de de 1,0, qui représente 50 % de réduction, et en se déplaçant (ligne pointillée dans le graphique) jusqu'à l'intersection de la droite d'ajustement, puis vers le bas jusqu'à l'axe horizontal, pour obtenir une CI_{50} d'environ 28 %. On pourrait estimer la CI_{20} de la même façon si on le désirait, mais il faudrait analyser des concentrations plus élevées avant d'estimer la CI_{80} (*cf.* 4.8.5).

4.5.2 Estimation de la CI_{50} à l'aide d'une calculatrice ou d'un ordinateur

L'analyste pourrait tracer une droite correspondant au rapport qui existe entre le logarithme de γ et celui de la concentration par des méthodes mathématiques d'usage courant; cependant, les guides Microtox ne couvrent pas ces étapes en détail. Il semble que le programme informatique de Microbics utilise une méthode de régression des moindres carrés pour le calcul de la CI_{50}; on pourrait donc trouver dans tout manuel de statistique la marche à suivre pour faire le calcul manuellement. Les valeurs de γ et des concentrations devraient d'abord être transformées en logarithmes naturels ou décimaux. À noter que les programmes informatiques de calcul des concentrations létales médianes (CL_{50}) ou des concentrations efficaces médianes (CE_{50}), que l'on peut se procurer facilement, s'appliquent uniquement à des données de type «tout ou rien» et *ne peuvent donc pas* être utilisés avec les données de l'essai Microtox.

On recommande le logiciel de Microbics comme méthode analytique de choix, étant donné que les ordinateurs personnels sont très répandus dans les laboratoires canadiens. Microbics fournit ce logiciel en langage BASIC, qui est compatible avec les ordinateurs personnels IBM. On recommande l'acquisition de la version 6.0 (de la fin de 1991) pour remplacer tout programme antérieur en vue de l'essai Microtox. Ce logiciel est conçu en fonction du nouveau modèle 500 de l'analyseur Microtox (*cf.* section 5), mais il peut également être utilisé avec le modèle 2055. Avec le modèle 500, le logiciel transfère automatiquement à un ordinateur les mesures photométriques prises au cours de l'essai, et il peut également le faire avec le modèle 2055 si celui-ci est doté d'un adaptateur conçu à cette fin.

Le programme informatique s'adapte à diverses conditions, dont différentes gammes de concentrations; en fait, il peut traiter les données de tous les types d'essais étudiés dans le présent rapport. Il existe des options d'impression des étapes intermédiaires des calculs, mais, habituellement, l'imprimé contient des détails sur la substance analysée, une description des principales variables de l'essai, les valeurs des concentrations et de γ, une estimation de la CI_{50} et de ses limites de confiance, ainsi qu'un graphique portant les observations et la droite d'ajustement. Lorsqu'on utilise le programme informatique, il est impératif de vérifier la vraisemblance des mesures de réduction de la bioluminescence et de l'estimation de la CI_{50}. L'impression des étapes intermédiaires des calculs aide à effectuer ce contrôle[23].

Dans la division 4.8.5, on explique pourquoi il est souhaitable de fonder les calculs sur des valeurs mesurées qui sont supérieures et inférieures à 50 % de réduction de la bioluminescence. On y traite également d'autres résultats qui pourraient s'avérer utiles, comme la CI_{20}.

4.6 Produit toxique de référence

L'utilisation courante d'un ou de plusieurs produits toxiques de référence est nécessaire

---

23 Le comité des utilisateurs de l'essai Microtox dans l'Ouest canadien (*Western Canada Microtox Users Committee*) a analysé des données à l'aide de différents programmes informatiques et a obtenu des résultats très similaires. Toutefois, pour les données extrapolées, on observe plus de variabilité dans les résultats des différents programmes. Les analystes auraient avantage à effectuer des vérifications internes par diverses méthodes et à comparer leurs techniques et leurs résultats avec ceux d'autres laboratoires par l'entremise de regroupements non officiels comme le comité des utilisateurs dans l'Ouest.

à l'évaluation, dans des conditions d'essai normalisées, de la sensibilité relative des bactéries après reconstitution, de l'exactitude des techniques de dilution et des autres facteurs influant sur la précision et la fiabilité des données obtenues en laboratoire pour ce ou ces produits (Environnement Canada, 1990d). On devrait analyser un ou des produits toxiques de référence au moins une fois par mois où l'on fait des essais Microtox ainsi qu'à la première utilisation d'un nouveau lot ou d'un nouvel envoi de réactif bactérien. Les conditions d'essai et les méthodes d'analyse devraient être les mêmes que d'habitude, telles que décrites dans le présent rapport et dans la documentation de Microbics.

Les critères appliqués au choix des produits toxiques de référence convenant à ces essais sont les suivants :

- facilité d'obtention du produit à l'état pur;
- durée de conservation prolongée (stabilité);
- solubilité élevée dans l'eau;
- stabilité en solution aqueuse;
- risque minimum pour l'utilisateur;
- facilité et précision de l'analyse;
- courbe dose-effet satisfaisante pour l'essai Microtox;
- influence connue du pH sur la toxicité du produit, le cas échéant.

Quatre produits chimiques sont recommandés comme produits toxiques de référence pour l'essai Microtox, et les laboratoires peuvent en utiliser un ou plusieurs.

Le phénol de qualité «réactif» est un de ces produits. Microbics précise que, pour le phénol, la CI_{50} après 5 min pour les valeurs comprises entre 13 et 26 mg/L devrait être atteinte à 15 °C. Kaiser et Ribo (1988) ont relevé dans diverses études 11 valeurs de la CI_{50} après 5 min dont la moyenne se situe à 30 mg/L. La solution mère de phénol devrait être préparée le jour de l'essai.

On peut également utiliser du sulfate de zinc ou du bichromate de potassium comme produits toxiques de référence, tous deux s'étant révélés satisfaisants dans des laboratoires du Canada. Microbics recommande l'utilisation de zinc, la CI_{50} approximative après 5 min se situant entre 1,4 et 2,7 mg/L à 15 °C. Le chrome contenu dans le bichromate de potassium est cancérogène, et il faudrait le manipuler en prenant certaines précautions (Environnement Canada, 1990d). Le laurylsulfate de sodium est un autre choix possible. Le BNQ (1987) en recommande l'utilisation, les concentrations d'essai suggérées couvrant l'intervalle de 0,5 à 25 mg/L; Kaiser et Ribo (1988) ont relevé sept CI_{50} dont la moyenne géométrique se situe à 1,3 mg/L. Cette substance ne fait pas partie de la liste des produits toxiques de référence recommandés par Environnement Canada (1990d).

Les concentrations des produits toxiques de référence dans les solutions mères devraient être mesurées au moyen de méthodes chimiques appropriées (p. ex., APHA *et al.*, 1989). Le calcul de la CI_{50} devrait être fondé sur les moyennes géométriques des concentrations mesurées, si ces moyennes diffèrent sensiblement (c.-à-d. de 20 % ou plus) des concentrations nominales et si les analyses chimiques sont exactes et fiables.

Une carte de contrôle (Environnement Canada, 1990d) devrait être établie et mise à

jour pour chaque produit toxique de référence utilisé. Les CI_{50} successives sont portées sur cette carte; on les examine afin de savoir si les résultats s'inscrivent dans un intervalle de plus ou moins deux fois l'écart-type des valeurs obtenues lors des essais précédents. On recalcule la moyenne géométrique des CI_{50} et ses limites de contrôle (± 2 fois l'écart-type, selon une base géométrique [logarithmique][24]) pour chaque CI_{50} successive jusqu'à ce que les statistiques se stabilisent (EPA, 1989a; Environnement Canada, 1990d).

Lorsqu'une CI_{50} s'inscrit en dehors des limites de contrôle, le réactif, le système d'essai ou la technique sont suspects. Dans la mesure où cela peut se produire 5 % du temps du fait du hasard seulement, une valeur qui s'inscrit en dehors de ces limites ne signifie pas nécessairement qu'il faille mettre en question la sensibilité du réactif ou la précision des données de toxicité produites par le laboratoire; il s'agit plutôt d'un avertissement que cela pourrait être le cas. Il serait sage d'effectuer une vérification minutieuse de toutes les conditions de l'essai et d'envisager l'utilisation d'un nouveau lot de réactif bactérien.

Le recours à des limites de contrôle n'indique pas nécessairement qu'un laboratoire produit des résultats constants. Un laboratoire qui produirait des résultats extrêmement variables pour un produit toxique de référence aurait des limites de contrôle très larges; un nouveau point de données pourrait se situer à l'intérieur des limites de contrôle, mais il n'en représenterait pas moins une variation non souhaitable des résultats obtenus dans les essais. Environnement Canada (1990d) suggère comme limite, à titre provisoire, un coefficient de variation de 20 ou 30 %. Cela semble un intervalle raisonnable, mais, pour établir une limite des variations admissibles des résultats, il faudrait accumuler davantage de données sur la reproductibilité que les laboratoires canadiens peuvent atteindre au cours d'essais Microtox portant sur divers produits toxiques de référence, dans des conditions d'essai normales.

4.7 Considérations juridiques

Au moment de la rédaction du présent rapport, des essais de toxicité utilisant des bactéries ont été imposés à une industrie dans au moins deux provinces canadiennes. Il convient donc de formuler des commentaires sur l'utilisation de l'essai Microtox à des fins de réglementation. La détermination des résultats de l'essai à des fins juridiques dépasse la portée du présent rapport; on peut toutefois recommander certaines pratiques générales utiles.

Si les données des essais sont susceptibles d'être utilisées aux fins de poursuites judiciaires, on doit veiller à ce que les échantillons soumis à l'essai soient recevables en preuve. Pour cela, les échantillons doivent : être représentatifs de la substance échantillonnée; ne pas être contaminés par des substances étrangères; être identifiés avec précision (date, heure et lieu d'origine); être accompagnés de documents établissant clairement la chaîne de possession; et être analysés le plus tôt possible après leur prélèvement. Les personnes responsables de l'exécution de l'essai et de la rédaction du procès-verbal doivent assurer la continuité de la preuve en cas de procédures judiciaires

---

24 Lorsqu'on ne peut obtenir une distribution log-normale des CI_{50}, il se peut qu'une moyenne arithmétique accompagnée d'un écart-type se révèle plus appropriée.

(McCaffrey, 1979) ainsi que l'intégrité des résultats des essais.

4.8 Écarts par rapport aux méthodes de base

4.8.1 Essai de détermination de l'ordre de grandeur

Il est généralement utile d'évaluer, par un essai préliminaire, la toxicité approximative d'un échantillon de toxicité inconnue. Les résultats peuvent démontrer l'à-propos d'un essai final à des concentrations plus faibles que les concentrations standard, ou dans un intervalle plus étroit (facteur plus faible entre les concentrations; *cf.* 4.2.2).

On peut exécuter rapidement cet essai préliminaire de détermination de l'ordre de grandeur (Microbics, 1983, nº M101; 1988a) en ajoutant 10 µL d'échantillon à une cuvette standard contenant, comme dans la méthode de base, 500 µL de diluant et 10 µL de réactif bactérien reconstitué; on obtient ainsi une dilution à 2 % environ de l'échantillon. Une réduction de la bioluminescence de 60 % après 5 min indiquerait une toxicité extrême de l'échantillon. L'essai final pourrait alors se faire sur une dilution au dixième de l'échantillon.

En général, lorsque la bioluminescence diminue de 60 % en 5 min au cours de l'essai préliminaire, on recommande une dilution au dixième de l'échantillon avant les préparatifs habituels de l'essai Microtox (*cf.* 4.2). Si la réduction de la bioluminescence était comprise entre 20 et 60 % au moment de l'essai préliminaire, on procéderait à une dilution initiale au cinquième. L'essai de détermination de l'ordre de grandeur est suffisamment rapide pour être fait pendant la période de stabilisation de la bioluminescence; il suffit de préparer quelques cuvettes supplémentaires de diluant et de réactif reconstitué, que l'on place dans la rangée C de l'analyseur.

4.8.2 Répétitions

À titre de précaution, on recommande de préparer une répétition de la solution de contrôle, car une mesure anomale dans une seule cuvette témoin fausserait le résultat global.

Si on le désire, on peut préparer des répétitions des concentrations soumises à l'essai, bien que, d'après leur expérience d'ensemble, les laboratoires canadiens concluent que cela n'est pas nécessaire (*cf.* 3.1.1). Les répétitions pourraient être placées dans les puits de la rangée C et subir les mêmes opérations que les solutions dans les cuvettes de la rangée B. On devrait alors augmenter la quantité de liquide dans les cuvettes de la rangée A. Dans la division 4.2.2, les modifications suivantes seraient apportées à la méthode de base. À l'étape *b*), on ajouterait 1 500 µL (au lieu de 1 000 µL) de diluant aux cuvettes A1 à A4. À l'étape *c*), on ajouterait à la cuvette A5 3 000 µL d'échantillon et 300 µL de solution *MOAS*. La quantité transférée à l'étape *d*) serait de 1 500 µL au lieu de 1 000 µL. Au point 4.3.2 *c*), on effectuerait ensuite des transferts dans les cuvettes de la rangée C à partir de la rangée A, de la même façon et en mesurant les mêmes volumes de liquide qu'on l'a fait pour les transferts dans la rangée B.

4.8.3 Échantillon non dilué

La concentration la plus élevée dans la méthode de base est de 45 % (*cf.* 4.2), mais, parfois, un analyste pourrait souhaiter d'analyser un échantillon non dilué ou presque. Il est possible d'analyser un échantillon d'une concentration de 90 % en omettant l'addition de diluant et en ajustant

la salinité de l'échantillon avec la solution *MOAS*. On peut aussi analyser un échantillon pratiquement non dilué en n'y ajoutant pas de diluant ni de solution *MOAS*, et en utilisant des cristaux de NaCl de qualité analytique pour amener sa salinité à 2 %. La bioluminescence au temps zéro ne peut être mesurée dans ce cas, puisque le réactif est ajouté directement à l'échantillon. La diminution de la bioluminescence dans chaque dilution de l'échantillon est estimée par comparaison avec un témoin de diluant.

Microbics (1989b) recommande de ne pas faire d'essais avec des échantillons non dilués présentant une forte toxicité (c.-à-d. dont la toxicité est encore mesurable dans des dilutions); la précision pourrait être moins bonne, car les essais sur de tels échantillons présentent une sensibilité très élevée à la technique employée par l'analyste.

La méthode d'analyse d'un échantillon non dilué est en fait très semblable à celle qui est décrite aux étapes *a*) à *d*) de la division 4.2.2 et aux étapes *a*) à *c*) de la division 4.3.1, mais nous la répéterons ci-dessous. Il s'agit essentiellement de la méthode décrite par Microbics (1989b), sauf que l'on utilise une seule série de cuvettes (A1 à A5). On trouvera dans Dutka (1988) les grandes lignes d'une méthode similaire s'appliquant à plusieurs répétitions pour un échantillon à 99 %.

a) Déposer 1 000 µL de solution de reconstitution dans une cuvette dans le puits réfrigéré.

b) Mettre 1 000 µL de diluant dans les cuvettes A1, A2, A3 et A4.

c) Déposer 200 µL de solution *MOAS* dans la cuvette A5, pour l'échantillon à 90 %.

d) Ajouter 2 000 µL d'échantillon à la cuvette A5, mélanger et jeter 200 µL.

e) Transférer 1 000 µL de A5 à A4 et mélanger A4.

f) Transférer 1 000 µL de A4 à A3 et mélanger A3.

g) Transférer 1 000 µL de A3 à A2, mélanger A2 et jeter 1 000 µL.

h) Attendre 5 min pour laisser la température se stabiliser.

i) Reconstituer une fiole de réactif bactérien de la manière habituelle (*cf.* 4.3.1 *a*)).

j) Faire démarrer le chronomètre. Transférer 10 µL de réactif reconstitué dans chacune des cinq cuvettes A1 à A5[25], et mélanger dans le même ordre à l'aide d'un micropipetteur de 500 µL.

k) Après 5 min et 15 min, effectuer une mesure de la bioluminescence dans chaque cuvette et faire les compilations et les calculs nécessaires en comparant les cuvettes A2 à A5 à la cuvette témoin A1. Les concentrations, en ordre décroissant, sont les suivantes : 90,0, 45,0, 22,5, 11,3 et 0 %.

Pour analyser un échantillon non dilué, ne pas mettre de solution *MOAS* dans la cuvette A5, à l'étape *c*). Déposer plutôt 40 mg de NaCl sec dans cette cuvette et le dissoudre dans l'échantillon ajouté. Ne pas jeter de liquide de la cuvette A5 à l'étape *d*). La

---

25 Il est important que le réactif bactérien ne soit pas contaminé par l'échantillon toxique par l'intermédiaire du micropipetteur. Il faut donc changer la pointe après chaque transfert.

concentration d'essai de la cuvette A5 est proche de celle de l'échantillon non dilué. En raison de l'addition de réactif, on peut considérer que l'échantillon a une concentration de 99 %[26].

4.8.4 Utilisation de sucrose pour ajuster la pression osmotique

La sensibilité du système Microtox à certains métaux et à l'ammoniac peut être accrue par l'emploi de sucrose, au lieu de chlorure de sodium, comme base du diluant. Microbics (1988c) précise que le facteur de réduction de la CI_{50} est de 34 en présence d'un sel de cadmium, de 36 en présence d'un sel d'ammoniac et de 15, 10 et 10 en présence de sels de nickel, de cuivre et de zinc, mais que la CI_{50} varie peu en présence de sels d'arsenic, de chrome et de mercure. De plus, le diluant au sucrose ne réduit pas la sensibilité de l'essai Microtox à d'autres types de substances toxiques analysées (phénol, octanol, xylène et cyanure de potassium). Ankley *et al.* (1990) ont confirmé des augmentations importantes de la sensibilité au zinc et au nickel en présence de sucrose, mais ils ont observé peu de différence dans le cas du cuivre et ils ont obtenu des résultats semblables pour la plupart des 44 effluents non dilués qu'ils ont soumis à l'essai.

Cette adaptation de la méthode Microtox conviendrait manifestement à l'analyse de métaux et de l'ammoniac à l'état de produits chimiques purs. Elle pourrait également être utile comme complément de la méthode de base dans le cas des effluents et des autres échantillons environnementaux dans lesquels certains métaux ou l'ammoniac pourraient être des causes importantes de toxicité.

La méthode à utiliser comporte peu de changements par rapport à la méthode de base. Au lieu de la solution *MOAS*, on doit ajouter 2 g de sucrose solide (qualité ACS) à 10 mL de l'échantillon, puis transférer 2 mL de cet échantillon modifié dans la cuvette A5. Au lieu du diluant habituel, on ajoute 1 000 µL de diluant au sucrose (solution à 20 % de sucrose) à chacune des cuvettes A1 à A4, et 500 µL à chacune des cuvettes B1 à B5. On fait ensuite la série de dilutions, le mélange avec le réactif et la mesure des résultats en suivant la méthode générale. Les concentrations soumises à l'essai dans les cuvettes B2 à B5 sont respectivement de 6,19, 12,4, 24,8 et 49,5 %.

4.8.5 Autres résultats

Qu'on estime la CI_{50} à l'aide d'un graphique ou encore d'une calculatrice ou d'un ordinateur, il est possible d'estimer des concentrations causant d'autres pourcentages d'effet, comme la CI_{20} ou la CI_{80}. Bien que l'on recommande, dans le présent rapport, d'utiliser la CI_{50} comme mesure d'effet standard, on pourrait évaluer les concentrations causant des pourcentages d'effet différents si cela s'avérait approprié à des fins particulières. On devrait cependant toujours indiquer la CI_{50} dans le procès-verbal de l'essai, si on peut l'estimer. Des limites de confiance à 95 % devraient également être calculées pour toute estimation à d'autres pourcentages d'effet. On ne devrait pas pousser cela à l'extrême; il serait illusoire de tenter de calculer un «seuil de toxicité» tel que la CI_1 ou la $CI_{0,1}$. D'après une longue série d'essais, dont on a parlé à la division 3.1.1, le ministère de l'Environnement du Québec a conclu que 17 % d'inhibition de la bioluminescence est

---

26 Si la concentration était calculée en fonction de la masse et corrigée pour tenir compte du sel ajouté, elle serait de 97,1 %.

le pourcentage minimal pouvant être quantifié tout en ayant une signification statistique (BNQ, 1987). Une réduction de 20 % correspond à une valeur de γ de 0,25, et la CI_{80} correspond à une valeur de γ de 4,0; on trouvera dans Beckman (1982) d'autres correspondances de ces valeurs.

Les estimations d'une concentration inhibitrice particulière (CI_{50}, CI_{80}, etc.) devraient être calculées uniquement lorsqu'on a obtenu des pourcentages d'effet à des concentrations supérieures et inférieures. Dans tout essai de toxicité, le résultat le plus fiable se situe dans l'intervalle des concentrations qui ont été analysées et qui ont fourni des données utiles. En particulier, il n'est pas souhaitable de faire une extrapolation en vue d'estimer une CI_{50} à partir de données qui n'indiquent que des effets se situant en deçà de 50 %. Par conséquent, pour qu'une concentration inhibitrice à un pourcentage d'effet donné soit valide aux fins d'Environnement Canada, nous recommandons qu'elle comporte au moins un point de données qui soit supérieur à ce pourcentage[27].

Les extrapolations peuvent fournir certains renseignements, particulièrement dans la méthode de base où la concentration la plus élevée est de 45 %; en effet, comme la CI_{50} la plus élevée considérée comme valide se situerait à environ 45 %, on pourrait évidemment dire dans ce cas que «la CI_{50} est supérieure à 45 %». D'un autre côté, il pourrait être possible et utile d'estimer la CI_{20} plutôt que la CI_{50}. Une CI_p obtenue par extrapolation pourrait servir à des fins de comparaison générale, par exemple pour établir le degré de toxicité relatif de divers effluents. Tout résultat de ce type devrait être clairement qualifié de «prévu», d'«extrapolé», ou d'un autre adjectif approprié.

4.9 Méthode applicable aux échantillons colorés ou turbides

On devrait effectuer l'essai de toxicité sur diverses concentrations de l'échantillon en suivant la méthode habituelle, puis procéder à une correction en utilisant la méthode exposée ci-après. On emploie pour cela la cuvette de correction photométrique (*Colour Correction Cuvette* ou *CCC*), qui est une cuvette à double paroi, c'est-à-dire formée d'un tube étroit inséré dans un tube de dimensions normales; elle est réutilisable et on peut se la procurer chez Microbics. Pour transférer du liquide sans former de bulles, on se sert de la pipette d'aspiration fournie avec la cuvette ou d'une autre pipette à pointe longue. On ne peut utiliser cette méthode avec les échantillons qui réfléchissent la lumière, ni avec l'analyseur de modèle 500, qui nécessite des volumes d'échantillons différents.

Une fois que l'essai ordinaire est fait avec l'échantillon, on procède comme suit :

a) Mettre 1 500 µL de diluant dans la chambre extérieure de la *CCC* et placer celle-ci dans le puits C1. Mettre

---

27 Microbics (1983, n° M110) soutient que l'on peut extrapoler avec un certain degré de certitude dans l'essai Microtox, parce que cet essai mesure un taux d'activité biologique plutôt qu'un effet par «tout ou rien» tel que la mort de poissons dans un essai de létalité. Cette affirmation est vraie jusqu'à un certain point, mais il pourrait ne pas être toujours exact de supposer qu'une relation linéaire à de faibles concentrations continue avec la même pente à de fortes concentrations, ou vice-versa. Par exemple, on trouve dans Beckman (1982) quelques graphiques logarithmiques non linéaires de la valeur de γ par rapport à la concentration. Des analystes canadiens ont aussi signalé l'obtention de telles courbes irrégulières.

1 000 µL de diluant dans une cuvette ordinaire dans le puits C2 et 1 500 µL dans le puits C4.

b) Introduire 1 500 µL d'une concentration donnée de l'échantillon dans une cuvette standard dans le puits C3. Normalement, il s'agirait de la concentration la plus élevée qui a donné des résultats utilisables dans l'essai que l'on vient de terminer, ou de la concentration la plus proche de la CI_{50} que l'on vient de déterminer. Attendre au moins 5 min pour que la température se stabilise.

c) Ajouter 50 µL de réactif reconstitué à la cuvette C2 et mélanger. Attendre au moins 10 min pour qu'il y ait stabilisation de la bioluminescence.

d) À l'aide de la pipette d'aspiration, déposer du liquide de la cuvette C2 dans la chambre intérieure de la *CCC*, jusqu'à un niveau égal à celui du liquide de la chambre extérieure.

e) Placer la *CCC* dans le puits de la tourelle. Ajuster la cellule photoélectrique pour que la mesure soit de 90 % environ et enregistrer les mesures jusqu'à ce qu'il soit évident que le taux de diminution est stable, puis garder les mesures des quatre dernières minutes pour les calculs.

f) Sans déplacer la *CCC*, enlever le diluant de la chambre extérieure au moyen de la pipette d'aspiration, puis transférer 1 500 µL de la concentration à expérimenter de la cuvette C3 à la chambre extérieure. Enregistrer les mesures de la bioluminescence jusqu'à ce qu'il soit évident que le taux de diminution est stable; ici encore, on ne garde que les mesures des quatre dernières minutes pour les calculs.

g) Sans déplacer la *CCC*, enlever l'échantillon de la chambre extérieure à l'aide de la pipette d'aspiration, puis la remplir de diluant provenant de la cuvette C4. Enregistrer les mesures photométriques pendant au moins 3 min.

h) Sur l'enregistrement graphique, mesurer la perte de transmission de la lumière attribuable à l'échantillon au moyen de la méthode graphique de Microbics (1988b). La mesure faite sur l'échantillon (I_f) correspond simplement à la dernière mesure enregistrée à l'étape *f*) (en haut à droite). On détermine par interpolation la transmission de la lumière avec le diluant (I_p) au moment de la mesure prise sur l'échantillon. Pour ce faire, on trace des lignes droites sur trois mesures apparaissant sur l'enregistrement graphique: une ligne qui joint les dernières mesures (en haut à droite) faites aux étapes *e*) et *g*), puis une droite tracée vers le haut à partir de la mesure finale (en haut à droite) faite à l'étape *f*). L'intersection de ces lignes donne la valeur I_p, soit la transmission de la lumière avec le diluant.

S'il y a plusieurs échantillons à analyser par la technique de correction photométrique, on peut tous les traiter à la suite avant la deuxième mesure prise sur le diluant à l'étape *g*). À cette étape, une fois que l'échantillon est enlevé de la chambre extérieure, on le remplace par l'échantillon suivant, on prend une mesure comme précédemment, et ainsi de suite pour tous les échantillons. Enfin, on termine l'étape *g*) en prenant la mesure avec le diluant dans la chambre extérieure. Les estimations graphiques prévues à l'étape *h*) se fondent sur une série de lignes verticales tracées d'après les mesures finales de la bioluminescence des échantillons (en haut à

droite), en vue de déterminer une série d'interpolations avec le diluant (I_p) devant servir à corriger les mesures obtenues pour les échantillons respectifs.

La correction de la CI_{50} se fait au moyen de constantes dérivées des proportions géométriques de la cuvette de correction photométrique. Microbics recommande d'employer une calculatrice ou un ordinateur pour faire les calculs (*cf.* 4.5.2). Les formules de calcul manuel suivantes se retrouvent dans BNQ (1987) et Microbics (1988a), sous une forme légèrement différente.

Calculer comme suit l'absorbance résultant de la correction photométrique (A_C) :

$$A_C = 3{,}1 \ln (I_p / I_f)$$

Pour toute concentration soumise à l'essai (C_x), calculer comme suit l'absorbance due à l'échantillon (A_x) :

$$A_x = A_C (C_x / C)$$

Convertir cette absorbance en la transmittance prévue à la concentration soumise à l'essai (T_x), au moyen de la formule suivante :

$$T_x = (1 - e^{-A_x}) / A_x$$

Calculer une valeur corrigée de γ (γ_c), à partir de la valeur de γ calculée pour la concentration à l'essai (γ_x), comme suit :

$$\gamma_c = T_x (1 + \gamma_x) - 1$$

où :

A_C = absorbance résultant de la correction photométrique à la concentration C

A_x = absorbance à la concentration C_x

C = concentration de l'échantillon utilisé pour l'essai de correction photométrique

C_x = toute concentration (précisée) soumise à l'essai

e = base des logarithmes naturels

I_0 = bioluminescence au temps zéro

I_5 = bioluminescence après 5 min

I_f = bioluminescence de l'échantillon utilisé pour l'essai de correction photométrique (obtenue sur l'enregistrement graphique)

I_p = bioluminescence du diluant utilisé pour l'essai de correction photométrique (obtenue par interpolation à partir de l'enregistrement graphique)

T_x = transmittance calculée à la concentration C_x

γ_x = valeur de γ calculée initialement à la concentration C_x

γ_c = valeur corrigée de γ

On se sert ensuite des valeurs corrigées de γ aux concentrations soumises à l'essai pour calculer une CI_{50} corrigée. À cette fin, on suppose que l'interférence de la couleur correspond à une relation linéaire à toutes les concentrations, ce qui pourrait parfois ne pas être vrai. On pourrait mesurer l'absorbance à chaque concentration, mais cette lecture est rarement justifiée; on pourrait tout au plus faire une nouvelle vérification à une concentration élevée de l'échantillon, comme on le mentionne dans Beckman (1982).

Section 5

Méthodes applicables à l'analyseur de modèle 500

Toutes les méthodes de la section 4 s'appliquent à l'analyseur Microtox de modèle 2055 qui était, jusqu'à tout récemment, le plus couramment employé dans les laboratoires canadiens. Beaucoup des méthodes générales et des principes décrits à la section 4 s'appliquent également au nouvel analyseur de modèle 500 (1989), mais il existe quelques différences. Elles sont expliquées ci-après et illustrées au tableau 2 et à la figure 4.

5.1 Principales différences

Les principales différences entre les analyseurs des modèles 2055 et 500 (*cf.* tableau 2) sont les suivantes :

a) Dans l'analyseur de modèle 500, la plupart des fonctions sont automatisées, y compris la descente d'une cuvette donnée dans la position de mesure de la bioluminescence, sur simple pression d'un bouton. Cette caractéristique permet d'uniformiser plus facilement la synchronisation et le rythme des mesures. Toutefois, le nouveau modèle peut être commandé manuellement, si on le désire, pour toutes les étapes utilisées avec le modèle 2055.

b) Le modèle 500 peut contenir 30 cuvettes au lieu de 15. On peut ainsi analyser trois échantillons simultanément, si on le désire.

Tableau 2 Comparaison des analyseurs Microtox des modèles 2055 et 500

Caractéristique	N° de modèle	
	2055	500
Nombre de puits d'incubation	15	30
Réglage de l'étendue (*SPAN*)	Manuel	Automatique
Réglage de la température	Manuel	Automatique
Réglage du zéro	Manuel	Automatique
Vérification de la haute tension (*HV*)	Manuelle	Automatique
Vérification de l'étalonnage (*CAL*)	Manuelle	Non nécessaire
Déplacement des cuvettes	Manuel	Automatique
Point d'accès à un ordinateur	Facultatif	Présent
Point d'accès à un enregistreur	Présent	Présent
Vérification de la tourelle	Manuelle	Automatique
Vérification des puits d'incubation	Manuelle	Automatique
Vérification de l'air	Manuelle	Automatique
Réglage de la sensibilité	Manuel	Automatique

c) Le nouvel analyseur est conçu de façon à transmettre les données à un ordinateur ou à un enregistreur graphique. Le logiciel offert par Microbics à la fin de 1991 (version 6.0) peut s'adapter facilement et comporte de nombreuses options permettant d'analyser différentes séries de concentrations, de faire des essais en double, de saisir les données manuellement ou automatiquement, etc. On peut également utiliser ce logiciel sur l'analyseur de modèle 2055, si celui-ci est doté d'une interface avec un ordinateur.

5.2 *Modifications particulières des méthodes*

Dans un guide publié récemment (1992), Microbics donne une description détaillée de la marche à suivre. En général, les liquides utilisés et leurs quantités, ainsi que le déroulement des opérations, restent tels que dans les sections précédentes. Certaines étapes de la méthode manuelle ne sont plus nécessaires; on les mentionne ci-dessous, par renvoi aux sections antérieures correspondantes du présent document. Certaines observations et recommandations de portée générale accompagnent la description des modifications.

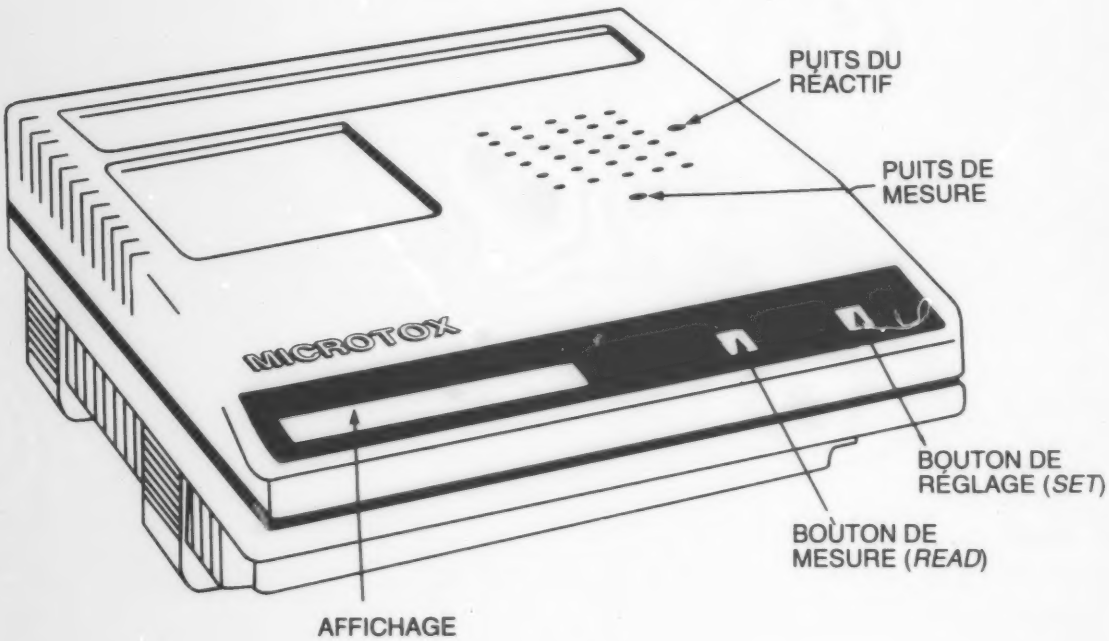


Figure 4 Aspect de l'analyseur de modèle 500 utilisé pour l'essai Microtox

Le modèle 500 est semblable au modèle 2055 (*cf.* figure 2), mais il possède des puits pour 30 cuvettes, il n'a pas de tourelle proéminente et il ne comprend pas de boutons de réglage. Les données de l'essai seraient vraisemblablement transmises à un ordinateur plutôt qu'à un enregistreur graphique.

3.2.2 *d*) Il est probable que l'enregistreur graphique ne sera pas l'option retenue par les analystes, étant donné qu'il est considéré comme étant quelque peu dépassé pour le nouvel analyseur. Le modèle 500 transmet les mesures à un micro-ordinateur (*cf.* 3.2.2 *e*)) aux fins d'enregistrement et de traitement ultérieur. On peut également relever les valeurs photométriques sur un affichage placé à l'avant de l'analyseur et les consigner à la main. Le modèle 500 ajuste les mesures à des valeurs relatives comprises entre 0 et 199. Au cours de la normalisation initiale, on assigne la valeur 0 à une mesure sans lumière, et une valeur proche de 95 à la mesure du blanc de réactif.

4.2.1 *a*) à *e*) L'analyseur vérifie automatiquement les températures et, s'il se produit des écarts par rapport à la température désirée, un voyant lumineux le signale à l'analyste. L'appareil effectue les étapes d'étalonnage lorsque l'on presse le bouton *SET* (réglage).

4.2.2 La version 6.0 du programme informatique de Microbics permet l'emploi de différentes séries de concentrations, tandis que les versions antérieures de ce logiciel nécessitaient des dilutions de moitié. Les utilisateurs de ces versions feraient bien de se procurer le nouveau logiciel.

4.3.2 *b*) Il est peu probable que les temps de mesure soient indiqués sur un enregistrement graphique. Si les données sont transmises directement à un ordinateur, le programme signale le moment approprié pour effectuer les mesures. Sinon, on doit se servir d'un chronomètre.

4.5 *a*) et *b*) Les calculs du rapport du témoin et de la valeur de γ seront très probablement faits par un programme informatique (*cf.* 4.5.2). L'analyste devrait obtenir un tracé produit par l'ordinateur et vérifier tous les calculs et toutes les données pour détecter des valeurs invraisemblables. On devrait examiner toute anomalie apparente, jusqu'à refaire les calculs ou le tracé manuellement. En particulier, si la CI_p est supérieure à la concentration la plus élevée soumise à l'essai, elle n'est pas considérée comme étant valide aux fins d'Environnement Canada. Elle peut cependant être qualifiée de «provisoire», d'«extrapolée» ou d'un autre adjectif du genre et servir à des fins de comparaison générale (*cf.* 4.8.5).

4.9 Dans le cas de la technique de correction photométrique, la méthode, les manipulations et les mesures sont semblables, dans l'ensemble, à celles que l'on utilise avec le modèle 2055, à l'exception de certains détails. Aucune analyse graphique n'est effectuée à partir de mesures sur un enregistrement graphique, mais on calcule arithmétiquement une valeur corrigée de I_0, que l'on utilise dans le programme pour évaluer la CI_{50} ou la CI_p.

Section 6

Méthodes particulières pour l'essai de produits chimiques

La présente section énonce des instructions particulières pour l'essai de produits chimiques, qui viennent s'ajouter aux méthodes exposées dans les sections 4 et 5.

6.1 Propriétés, étiquetage et stockage des échantillons

On devrait obtenir des renseignements sur les propriétés du produit chimique à expérimenter, notamment sa solubilité dans l'eau, sa tension de vapeur, sa stabilité chimique, ses constantes de dissociation et sa biodégradabilité. Il faudrait consulter la fiche technique sur la sécurité d'utilisation de ce produit, s'il en existe une. Il faudrait également recueillir et consigner les autres renseignements existants, par exemple la formule structurelle, le degré de pureté, la nature et le pourcentage des impuretés, les quantités d'additifs et le coefficient de partage *n*-octanol/eau[28]. Il faudrait en outre disposer d'une méthode admissible de dosage du produit en solution aqueuse dans l'intervalle prévu des concentrations d'essai, ainsi que de données relatives à la précision et à l'exactitude des dosages. Lorsque la solubilité dans l'eau du produit chimique est douteuse, les méthodes admissibles utilisées antérieurement pour la préparation de solutions aqueuses de ce produit devraient être consignées.

Les contenants devraient être fermés hermétiquement et, dès réception, codés ou étiquetés (nom du produit, fournisseur, date de réception, responsable des essais, etc.).

Les conditions de stockage (p. ex., température et protection contre la lumière) sont souvent dictées par la nature du produit. Les modes opératoires normalisés pour la manipulation et le stockage des produits chimiques doivent être respectés.

6.2 Préparation des solutions d'essai

S'il fallait analyser un nouveau pesticide ou un nouveau produit chimique d'une catégorie semblable dans le cadre d'un programme officiel de réglementation et d'homologation, les règlements applicables pourraient exiger l'emploi de répétitions des concentrations d'essai.

L'«échantillon» à analyser est une solution mère ou une dilution de celle-ci, préparée en dissolvant le produit chimique à expérimenter dans de l'eau désionisée. On devrait mesurer la concentration du produit chimique dans la solution (*cf.* 6.3) et déterminer sa stabilité avant de commencer l'essai. Les solutions mères sujettes à la photolyse devraient être gardées à l'obscurité, et les solutions instables doivent être préparées peu avant l'emploi. La salinité de l'échantillon devrait être ajustée à 2 % (*cf.* 4.2.2 *c*)) au début de l'essai. L'échantillon devrait satisfaire aux exigences en matière de couleur, de turbidité, de pH et de teneur en oxygène dissous précisées dans la sous-section 4.1. L'essai Microtox peut ensuite être effectué suivant la méthode universelle décrite à la section 4.

---

28 La connaissance des propriétés du produit chimique aide à déterminer les précautions particulières requises pour sa manipulation et pour les essais (p. ex., essais dans une installation bien ventilée). L'information concernant la solubilité et la stabilité du produit chimique est également utile dans l'interprétation des résultats des essais.

Dans le cas de produits chimiques qui ne se dissolvent pas facilement dans l'eau, les solutions mères peuvent être préparées au moyen de la technique de la colonne génératrice (Billington *et al.*, 1988; Shiu *et al.*, 1988) ou, comme second choix, par dispersion ultrasonique. Cette dernière technique peut produire des gouttelettes non uniformes et de tailles différentes, dont certaines pourraient migrer vers la surface du liquide, ou encore des gouttelettes n'ayant pas toutes la même biodisponibilité, ce qui pourrait créer des variations de la toxicité. Elle pourrait également avoir des effets sur la transmission de la lumière, qui constitue un facteur primordial dans l'essai Microtox. On ne devrait pas utiliser de solvants, d'émulsifiants ou de dispersants organiques pour accroître la solubilité du produit chimique, sauf dans les cas où ces substances pourraient être incorporées avec ce produit dans des formulations commerciales d'usage normal. Le cas échéant, on devrait préparer une solution de contrôle supplémentaire renfermant la plus forte concentration d'agent solubilisant qu'on retrouve dans les solutions d'essai. Ces agents devraient être utilisés parcimonieusement : leur concentration ne devrait pas dépasser 0,1 mL/L dans toute solution d'essai. Lorsqu'on utilise des solvants, il est préférable d'utiliser les produits suivants : diméthylformamide, diméthylsulfoxyde[29], triéthylèneglycol, méthanol, éthanol et acétone (EPA, 1985).

6.3 Observations et mesures sur les échantillons

Pendant la préparation de la solution mère, on devrait l'examiner afin d'observer la présence et l'évolution du produit chimique (p. ex., odeur, couleur et opacité de la solution, précipitation ou floculation du produit chimique). Toute observation devrait être consignée.

Il est souhaitable de mesurer la concentration du produit chimique dans la solution mère[30]. Des aliquotes devraient être préservées, stockées (si nécessaire) et analysées au moyen des meilleures méthodes éprouvées dont on dispose. Si l'on obtient une mesure de la concentration du produit chimique, on devrait l'utiliser pour calculer et exprimer la toxicité, à moins que l'on n'ait de bonnes raisons de penser que cette mesure n'est pas exacte.

---

29 Conserver le diméthylsulfoxyde sous sa forme liquide à 19 °C ou plus. S'il était congelé et dégelé à plusieurs reprises, sa toxicité pourrait s'accroître.

30 Il n'est pas nécessaire de faire une analyse de ce genre dans tous les cas, en raison des coûts à engager, des limites de l'analyse ou de l'existence de données techniques antérieures indiquant que le produit chimique est stable en solution dans des conditions semblables à celles qui prévalent pendant la préparation de la solution et l'exécution de l'essai. L'analyse est particulièrement recommandable si la substance à expérimenter est volatile ou peu soluble, ou encore si elle précipite ou est adsorbée par le contenant.

Section 7

Méthodes particulières pour l'essai d'échantillons d'effluents, de lixiviats et d'élutriats

La présente section énonce des instructions particulières pour l'essai d'échantillons d'effluents, de lixiviats et d'élutriats; ces instructions viennent s'ajouter aux méthodes exposées dans les sections 4 et 5. À noter que certains essais sur des sédiments peuvent exiger une analyse séparée de l'eau de porosité, selon la marche à suivre indiquée pour les élutriats.

7.1 Étiquetage, transport et stockage des échantillons

Les contenants utilisés pour le transport et le stockage des échantillons d'effluents, de lixiviats et d'élutriats doivent être fabriqués de matériaux non toxiques. Pour les échantillons de grand volume devant subir des essais sur des organismes plus gros en plus de l'essai Microtox, on accordera la préférence à des contenants en verre ou revêtus de Teflon^{MC}, qui sont inertes et n'adsorbent guère de produits chimiques. Les contenants de polyéthylène ou de polypropylène qui servent au transport d'eau potable sont moins intéressants, mais ils peuvent aussi être utilisés. Pour les échantillons plus petits destinés à subir uniquement l'essai Microtox, on recommande d'employer des contenants de verre borosilicaté munis d'un bouchon à vis revêtu de Teflon ou d'un autre type de fermeture reconnu comme non toxique.

Il est recommandé de prélever des échantillons de 500 mL à 1 L pour l'essai Microtox, de sorte qu'on puisse en utiliser des parties pour la mesure du pH initial, de l'oxygène dissous et d'autres propriétés (*cf.* 4.1.2, 4.1.3 et 7.4). Les contenants doivent être neufs, ou encore nettoyés à fond et rincés avec de l'eau non contaminée; ils devraient également être rincés avec l'échantillon à recueillir. Il faudrait les remplir de manière à réduire les vides d'air.

Au moment du prélèvement, chaque contenant doit être fermé hermétiquement et étiqueté ou codé. Les renseignements qui doivent figurer sur l'étiquette comprennent au moins le type et la source de l'échantillon, la date et l'heure du prélèvement ainsi que le nom du ou des préposés à l'échantillonnage. Les échantillons reçus par le laboratoire dans des contenants non étiquetés ou non codés ne devraient pas être retenus pour les essais. Il en est de même pour ceux reçus dans des contenants partiellement remplis, car les substances toxiques volatiles peuvent alors s'échapper dans le vide d'air. Par ailleurs, lorsqu'on sait que la volatilité ne pose pas de problème, ces échantillons pourraient faire l'objet d'essais, à la discrétion de l'analyste.

L'essai des échantillons d'effluents et de lixiviats devrait être entrepris le plus tôt possible après leur prélèvement. Chaque fois que possible, on devrait commencer les essais moins de 24 h après le prélèvement des échantillons, et on doit le faire moins de 72 h après ce moment. Les échantillons de sédiments ou de sols prélevés pour extraction et essai de l'élutriat devraient aussi faire l'objet d'un essai le plus tôt possible; il est recommandé de commencer les opérations d'extraction dans les deux semaines (de préférence, dans la semaine)

suivant l'échantillonnage, et l'essai doit commencer au plus tard six semaines après l'échantillonnage (Environnement Canada, 1993). On devrait suivre les méthodes établies par Environment Canada pour la préparation des élutriats. L'essai des élutriats doit commencer moins de 72 h après leur préparation ou dans les délais indiqués dans le règlement ou le protocole expérimental pertinent.

Tous les échantillons d'effluents ou de lixiviats devraient être gardés au frais pendant le transport (de 1 à 7 °C, de préférence à 4 ± 2 °C). Au moment du prélèvement, les échantillons chauds (plus de 7 °C) devraient être ramenés entre 1 et 7 °C avec de la glace ou des sacs réfrigérants. Au besoin, il faudrait utiliser de ces sacs ou d'autres moyens de réfrigération pour s'assurer que la température des échantillons demeure entre 1 et 7 °C durant le transport. Les échantillons ne doivent pas geler pendant le transport. Ils devraient être stockés à l'obscurité, dans des contenants fermés hermétiquement, à 4 ± 2 °C. Les sous-échantillons à analyser devraient être ramenés à 15 °C immédiatement avant l'essai.

Sauf indication contraire, la température pendant le transport et le stockage des élutriats ainsi que des échantillons destinés à l'extraction aqueuse et à l'essai ultérieur de l'élutriat devraient être conformes aux indications ci-dessus.

7.2 Préparation des solutions d'essai

Les contenants d'échantillons doivent être agités vigoureusement juste avant d'être vidés afin d'assurer la remise en suspension des solides décantables. Les sous-échantillons (c.-à-d. les échantillons répartis dans deux ou plusieurs contenants) doivent être mélangés ensemble afin d'assurer leur homogénéité. S'il est nécessaire de poursuivre le stockage, l'échantillon composite (ou une partie de cet échantillon) doit être retourné dans les contenants de sous-échantillons et stocké (*cf.* 7.1) jusqu'au moment de l'utilisation.

Le pH et la teneur en oxygène dissous de l'échantillon devraient être vérifiés par rapport aux limites précisées aux divisions 4.1.2 et 4.1.3.

Les essais de surveillance et de conformité devraient normalement porter, au minimum, sur une portion non diluée de l'échantillon (*cf.* 4.8.3) et sur une solution de contrôle. Les règlements peuvent exiger que l'on prévoie des répétitions de la solution de contrôle, de toutes les concentrations d'essai ou de certaines d'entre elles. Les essais de toxicité réalisés à d'autres fins (p. ex., pour déterminer les sources de toxicité à l'intérieur d'une usine, l'efficacité d'un traitement ou les effets de la modification de procédés sur la toxicité) peuvent, selon les objectifs de l'étude, porter sur une seule concentration ou sur des concentrations multiples. Les essais à concentration unique sont souvent un moyen économique d'établir la présence ou l'absence de toxicité ou de faire une évaluation préliminaire d'un nombre important d'échantillons afin d'établir leur toxicité relative.

7.3 Eau de dilution

Pour les rejets d'effluents en eau douce ainsi que les lixiviats et élutriats contenant de l'eau douce, le diluant décrit dans la méthode universelle devrait habituellement être utilisé pour les essais. Normalement, il ne convient pas d'employer comme eau de dilution de l'eau de surface provenant de

lacs, de rivières et de ruisseaux en vue de simuler les conditions locales[31].

Il existe d'autres options pour les effluents rejetés en mer et pour les élutriats obtenus en utilisant de l'eau de mer, comme pour l'évaluation de sédiments marins. Le choix de l'option à retenir dépend de l'objectif de l'essai. Si l'on souhaite obtenir un taux de toxicité «normalisé», on devrait suivre la méthode universelle en se servant du diluant Microtox ordinaire et de la salinité habituelle de 2 %. Si l'on veut simuler les conditions locales, la salinité de l'échantillon et celle du diluant devraient correspondre à celle du milieu récepteur. La bactérie *Photobacterium phosphoreum* servant aux essais présente une bioluminescence maximale dans l'intervalle de salinité de 2 à 3,7 %.

Il est recommandé d'utiliser de l'eau de mer non contaminée, plutôt que du diluant Microtox, si l'échantillon lui-même est composé essentiellement d'eau de mer, par exemple un élutriat d'eau de mer ou encore un lixiviat ou un effluent d'eau salée. En effet, la bactérie produit généralement beaucoup plus de lumière dans de l'eau de mer naturelle que dans le diluant, qui ne contient que du chlorure de sodium, même lorsque sa salinité est augmentée jusqu'au niveau de celle de l'eau de mer.

Il serait beaucoup moins indiqué d'utiliser le diluant Microtox pour l'essai d'un échantillon constitué essentiellement ou en grande partie d'eau de mer. En effet, comme la bioluminescence serait plus élevée dans l'eau de mer que dans une solution de NaCl, il y aurait un déséquilibre dans l'essai en ce qui concerne la bioluminescence «de fond» dans les diverses dilutions de l'échantillon. On ne résoudrait pas ce problème en augmentant la salinité du diluant (2 %), à l'aide de la solution *MOAS* ou de chlorure de sodium, jusqu'à un niveau normal pour de l'eau de mer, par exemple 3,5 %, ou jusqu'à la salinité de l'échantillon. On devrait ajuster la salinité de cette façon si l'on choisissait cette option pour quelque raison que ce soit, mais il serait préférable d'opter pour l'autre option décrite dans le paragraphe précédent, soit de remplacer le diluant Microtox par de l'eau de mer.

Si l'effluent, le lixiviat ou l'élutriat était à base d'eau salée, mais d'une salinité inférieure à celle de l'eau de mer, l'essai Microtox ne devrait pas être exécuté à moins de 2 % de salinité (sauf si l'on voulait déterminer un ordre de grandeur très approximatif). La bioluminescence diminue considérablement lorsque la salinité est réduite à moins de 2 % (Krebs, 1983). Cependant, on pourrait augmenter la salinité de toutes les solutions d'essai jusqu'à plus de 2 %, mais en deçà de la salinité de l'eau de mer elle-même, préférablement au moyen de quantités appropriées d'eau de mer non contaminée. Le principe directeur dans tout essai de ce genre est que la salinité de l'eau de mer «naturelle» devrait être constante dans toutes les cuvettes.

---

31 L'essai Microtox ne simule pas les conditions précises prévalant localement dans les plans d'eau douce, car il est exécuté à une salinité fixe de 2 %. Par conséquent, les estimations de la toxicité obtenues au moyen de diluant Microtox non contaminé sont plus adéquates comme valeurs de toxicité «normalisées» pour des produits chimiques, des eaux usées, des sédiments ou des substances solides en particulier.

Les polluants qui sont déjà présents dans le milieu récepteur peuvent ajouter leur toxicité à celle du produit chimique ou des eaux usées qui font l'objet de l'analyse. Lorsque c'est le cas, le diluant ordinaire non contaminé donnerait une estimation précise de la toxicité d'un effluent, d'un lixiviat ou d'un élutriat, mais pas nécessairement de son effet global dans la zone à l'étude.

7.4 Observations et mesures sur les échantillons

La couleur, la turbidité, l'odeur et l'homogénéité (c.-à-d. la présence de matières flottables ou de solides décantables) des échantillons d'effluents, de lixiviats ou d'élutriats devraient être observées au moment de la préparation des solutions d'essai. On devrait analyser les échantillons qui contiennent une quantité importante de solides pour déterminer leur teneur totale en particules en suspension (APHA *et al.*, 1989). La précipitation, la floculation, le changement de couleur, l'odeur ou les autres réactions au moment de la dilution avec l'eau devraient être consignés.

Si l'on craint qu'il y ait interférence dans la transmission de la lumière à cause d'une couleur vive ou de la présence d'une quantité importante de solides ou de matières flottantes ou émulsifiées, il faudrait procéder à une correction photométrique suivant la technique décrite à la division 4.1.1 et à la sous-section 4.9.

7.5 Résultats et calculs

Les essais de surveillance et de conformité aux exigences réglementaires pourraient porter sur une seule concentration et une solution de contrôle (*cf.* 7.2). Les résultats de ces essais dépendent toujours des objectifs de l'étude, mais il pourrait s'agir, notamment, de cotes arbitraires de réussite ou d'échec fondées sur un pourcentage de réduction de la bioluminescence à une concentration donnée. Pour les essais à concentrations multiples, le résultat serait la CI_{50}, comme le prévoit la sous-section 4.5.

Section 8

Méthodes particulières pour l'essai d'échantillons de milieux récepteurs

Le lecteur trouvera ci-après des instructions pour l'essai d'échantillons de milieux récepteurs, qui viennent s'ajouter aux méthodes exposées dans les sections 4 et 5.

8.1 Étiquetage, transport et stockage des échantillons

Les méthodes d'étiquetage, de transport et de stockage des échantillons de milieux récepteurs devraient être conformes aux dispositions de la sous-section 7.1. Les essais devraient être mis en route le plus tôt possible après le prélèvement des échantillons, de préférence moins de 24 h et pas plus de 72 h après l'échantillonnage.

8.2 Préparation des solutions d'essai

Les contenants devraient être agités avant d'être vidés, afin d'assurer l'homogénéité des échantillons. Les sous-échantillons devraient être composés comme le prévoit la sous-section 7.2. Lorsque les échantillons contiennent beaucoup de matières en suspension, on devrait prendre les précautions décrites à la division 4.1.1. Le pH et la teneur en oxygène dissous de l'échantillon devraient être vérifiés par rapport aux limites précisées dans les divisions 4.1.2 et 4.1.3.

8.3 Eau de dilution

Lorsqu'il s'agit d'eau douce de surface, on devrait utiliser la méthode de base (universelle). Pour les échantillons d'eau marine ou estuarienne de surface, d'autres méthodes sont possibles.

Si l'échantillon de milieu récepteur est lui-même composé d'eau de mer, on n'ajoute pas de solution *MOAS* à l'échantillon. En pareil cas, on recommande d'utiliser de l'eau de mer «naturelle» non contaminée comme diluant, c'est-à-dire comme eau de contrôle et de dilution des échantillons. Le principe et la méthode sont décrits plus en détail à la sous-section 7.3.

Si le milieu récepteur est estuarien, on doit mesurer sa salinité et l'ajuster à la hausse, s'il y a lieu, afin d'obtenir une salinité d'au moins 2 %, nécessaire à l'exécution de l'essai. Pour ce faire, on peut utiliser de la solution *MOAS* ou des cristaux de chlorure de sodium (NaCl), si on le veut; cependant, il serait très souhaitable que le diluant contienne de l'eau de mer non contaminée dont la salinité serait corrigée pour correspondre à celle de l'échantillon. Si l'échantillon de milieu récepteur a une salinité supérieure à 2 % mais inférieure à celle de l'eau de mer, il serait préférable d'utiliser comme diluant de l'eau de mer non contaminée, diluée pour obtenir une salinité égale à celle de l'échantillon. Encore une fois, le principe directeur de toute manipulation de ce genre est que chaque cuvette soumise à l'essai devrait contenir la même quantité d'eau de mer et la même quantité de NaCl, s'il y a lieu.

8.4 Observations et mesures sur les échantillons

La couleur, la turbidité, le moussage, la précipitation et les autres caractéristiques des échantillons devraient être observés conformément aux dispositions de la sous-section 7.4, pendant la préparation des solutions d'essai.

8.5 Résultats et calculs

Les résultats des essais portant sur des échantillons de milieux récepteurs devraient être conformes aux options et aux démarches prévues dans les sous-sections 4.5 et 7.5.

Les essais de surveillance et de conformité devraient normalement porter, au minimum, sur une portion non diluée de l'échantillon (*cf.* 4.8.3) et sur une ou plusieurs solutions de contrôle. Lorsqu'il est probable que les échantillons de milieu récepteur sont toxiques, comme dans le cas de zones de mélange, et que l'on désire obtenir des renseignements sur la dilution additionnelle ou sur les améliorations nécessaires pour obtenir des conditions satisfaisantes, on devrait effectuer un essai pour déterminer la CI_{50} conformément à la méthode de base de la section 4. Souvent, les échantillons d'eaux de surface ne seront pas suffisamment toxiques pour produire une CI_{50}. On peut alors utiliser le système Microtox pour catégoriser les eaux de surface en fonction de la perte de bioluminescence causée par un échantillon dilué à 45 %, soit à la concentration la plus élevée que l'on peut utiliser dans la méthode de base (Kaiser *et al.*, 1988a, 1988b).

Section 9

Méthodes particulières pour l'essai d'échantillons de sédiments et de solides assimilés

On trouvera dans la présente section des instructions générales pour l'essai de liquides provenant d'échantillons de sédiments ou de solides assimilés, comme les sols, ainsi que pour l'essai Microtox «en phase solide». Ces instructions viennent s'ajouter aux directives générales des sections 4 et 5. Dans la présente section, le terme «sédiment» est employé pour des raisons de commodité, mais il inclut des substances solides assimilées comme les sols et les boues provenant d'installations industrielles ou municipales, qui peuvent polluer les eaux de surface ou nécessiter des essais pour d'autres raisons.

9.1 Généralités

On donne ici des renseignements généraux sur l'utilisation de l'essai Microtox pour des essais avec des sédiments et de l'eau extraite de sédiments. Le présent rapport ne vise pas à fournir des instructions pour étudier les sédiments sur le terrain, pour les échantillonner ou pour en extraire des liquides ou des matières. On trouvera dans un document d'orientation d'Environnement Canada (1993) des recommandations détaillées pour le prélèvement, la manutention, le transport, le stockage et la manipulation des sédiments. Il faudrait suivre ces recommandations lorsqu'on prélève des échantillons de sédiments et qu'on les prépare en vue d'un essai Microtox. D'autres conseils sur ces questions sont fournis dans des livres (Mudroch et Macknight, 1991), des études de synthèse (Geisy et Hoke, 1989; McLeay et Sprague, 1991) et des méthodes normalisées (ASTM, 1991a, 1991b).

L'essai Microtox est généralement considéré comme une méthode rapide et utile pour comparer la toxicité d'extraits de sédiments contaminés (Schiewe *et al.*, 1985). Il est l'un des quatre essais de toxicité dont on a recommandé l'inclusion dans une série d'essais sur des sédiments, à la suite d'une étude de synthèse complète des essais disponibles (Geisy et Hoke, 1989). Une étude de 50 sédiments provenant de la côte de l'État de Washington a indiqué que l'essai Microtox, un essai sur des embryons d'huîtres et un essai sur des amphipodes ont produit des résultats concordants, mais qu'on aurait avantage à utiliser divers essais; l'essai Microtox a décelé la toxicité d'un nombre plus élevé de sédiments que chacun des deux autres essais (Williams *et al.*, 1986; Becker *et al.*, 1990). Une autre étude a montré que l'essai Microtox et un essai de toxicité sur des embryons d'échinodermes étaient les essais les plus sensibles parmi sept essais de sédiments évalués (Pastorok et Becker, 1989). Strosher (1984) a analysé 48 liquides surnageants de boues de forage et a conclu que les essais sur des bactéries luminescentes étaient plus sensibles, plus reproductibles, plus rapides et plus économiques pour évaluer la toxicité que deux essais sur des poissons et un essai sur la germination de graines.

Brouwer *et al.* (1990) ont utilisé l'essai Microtox en phase solide afin d'analyser des sédiments du port de Hamilton (Ontario). Ils ont constaté que cet essai était plus sensible

aux substances toxiques hydrophobes, comme les biphényles polychlorés (BPC), qu'un autre essai Microtox avec un élutriat liquide. De la même façon, l'essai en phase solide s'est révélé plus sensible que l'essai sur des liquides extraits lors de l'analyse de sédiments provenant du port de Halifax (Tay *et al.*, 1991) et de plusieurs autres zones industrielles du Canada (van der Geest, 1991).

9.1.1 Étiquetage, transport et stockage des échantillons

Les techniques générales utilisées pour l'étiquetage, le transport et le stockage des échantillons de sédiments devraient être conformes aux instructions de la sous-section 7.1. On devrait aussi suivre les recommandations additionnelles fournies par Environnement Canada (1993). Les limites de température sont celles qui sont indiquées à la sous-section 7.1, et il est à souligner que les échantillons ne doivent geler ni complètement, ni partiellement, et ne doivent pas sécher (Environnement Canada, 1993; ASTM, 1991b).

Pour les liquides dérivés de sédiments, il faudrait utiliser les contenants et les méthodes de manipulation décrits à la sous-section 7.1 au sujet des élutriats. Lorsque l'on a utilisé un solvant non aqueux pour extraire des substances, on devrait se servir d'un contenant en verre pour stocker le liquide obtenu, de sorte que ce contenant ne soit pas modifié par le solvant et que le liquide n'absorbe pas de substances par lixiviation.

Les essais devraient débuter le plus tôt possible après le prélèvement des échantillons. Les essais en phase solide ou les procédés d'extraction devraient commencer moins de deux semaines après l'échantillonnage et, de préférence, moins d'une semaine après. Les essais ne doivent pas débuter plus de six semaines après le prélèvement des échantillons[32]. Il faut commencer les essais avec les liquides extraits de sédiments moins de 72 h après leur préparation, ou dans le délai précisé dans le règlement ou le protocole pertinent.

9.1.2 Préparation des échantillons

Selon la nature des échantillons et les objectifs de l'essai, il se peut que l'on doive mélanger les échantillons pour les rendre homogènes avant de procéder aux essais. Le cas échéant, on doit s'assurer de bien le faire. Les sous-échantillons (c.-à-d. les échantillons répartis dans deux ou plusieurs contenants) doivent être mélangés ensemble. S'il est nécessaire de poursuivre le stockage, l'échantillon composite (ou une partie de cet échantillon) devrait être retourné dans les contenants de sous-échantillons.

9.1.3 Observations et mesures sur les échantillons

Pendant la préparation des solutions d'essai, on devrait effectuer des observations relatives à la couleur, à la turbidité, au moussage, à la précipitation, etc. sur les sédiments et sur tout liquide provenant de ceux-ci, conformément aux directives de la sous-section 7.4.

---

32 La toxicité et la géochimie des sédiments contaminés provenant du port de Hamilton auraient changé après un stockage de plus d'une semaine; cependant, les données devant étayer cette affirmation n'ont pas été fournies (Brouwer *et al.*, 1990). L'exécution des essais dans les deux semaines suivant l'échantillonnage est conforme aux techniques normalisées actuelles des États-Unis (ASTM, 1991b) et aux récentes lignes directrices d'Environnement Canada (1993). On a déterminé une période de stockage maximale acceptable de six semaines (Environnement Canada , 1993) en raison des difficultés d'ordre pratique qui se posent pour des périodes plus courtes, y compris le délai nécessaire s'il faut effectuer des analyses chimiques préliminaires.

9.1.4 Sédiments de contrôle ou de référence

Un ou plusieurs échantillons de sédiments de contrôle ou de référence doivent être analysés suivant la même technique que les sédiments à l'étude. Bien que la méthode d'essai prévoie l'utilisation d'un témoin ne contenant pas de substances provenant du sédiment à l'étude, l'expérience montre qu'il se peut que ce témoin ne suffise pas pour effectuer une évaluation acceptable de la toxicité. Les laboratoires d'Environnement Canada et d'autres organismes constatent souvent des effets toxiques apparents dans des sédiments non contaminés au cours d'essais sur une suspension solide-liquide (*cf.* 9.3). Par conséquent, pour chaque essai d'un sédiment ou d'une série de sédiments, il faudrait utiliser un ou plusieurs sédiments de contrôle ou de référence comme échantillons, pour faciliter la détermination d'un niveau «normal» ou de base.

À cette fin, il serait souhaitable de choisir un sédiment de référence normalisé ou une série de sédiments de référence ayant différentes caractéristiques, que l'on pourrait apparier aux sédiments à expérimenter. Il serait également souhaitable de vérifier s'il y a des différences significatives dans les résultats obtenus avec les sédiments de référence et les sédiments à expérimenter. L'essai d'un sédiment de contrôle ou de référence, ou d'un liquide extrait d'un tel sédiment, n'est pas nécessairement exigé dans les méthodes de Microbics, mais il fait partie intégrante de la méthode exposée dans le présent document. Les sédiments de contrôle ou de référence devraient être semblables aux sédiments à l'étude en ce qui a trait à leurs caractéristiques physiques et chimiques générales. En particulier, il faudrait tenter d'obtenir la même répartition granulométrique et le même équilibre entre substances organiques et inorganiques (ASTM, 1991a, 1991b; McLeay et Sprague, 1991; Environment Canada, 1993).

Il n'y a pas qu'une seule façon d'utiliser les résultats obtenus avec un sédiment de contrôle ou de référence. Si celui-ci ne présente aucune toxicité, les résultats obtenus avec le sédiment à expérimenter sont considérés comme valides, mais s'il révèle une certaine toxicité, il ne semble pas encore y avoir de méthode normalisée pour corriger les résultats obtenus avec le sédiment à expérimenter[33]. Il faudrait donc interpréter avec circonspection les résultats obtenus avec celui-ci. On pourrait effectuer des tests de signification statistique, avec l'aide d'un statisticien, si l'on dispose d'observations en double ou d'essais répétés.

9.2 Essai de liquides extraits de sédiments ou de solides assimilés

Les substances toxiques provenant des sédiments ou des sols peuvent passer à la phase aqueuse et avoir des effets sur les organismes présents dans les eaux de surface; l'essai Microtox peut s'avérer utile pour analyser ces effets. La phase aqueuse pourrait consister en un liquide provenant d'un sol ou d'un sédiment (p. ex., de l'eau interstitielle), ou en un liquide utilisé pour traiter l'échantillon et en extraire d'éventuelles substances toxiques (p. ex., un élutriat). Afin d'obtenir ces liquides, on devrait suivre les méthodes recommandées par Environnement Canada (1993) pour l'extraction de l'eau de porosité ou pour la préparation d'un élutriat.

---

33 Brouwer *et al.* (1990) ont effectué une correction de ce genre en exprimant la bioluminescence du sédiment à expérimenter en tant que pourcentage de celle du sédiment de contrôle ou de référence. Cependant, une seule concentration de chaque sédiment a été mise à l'essai, et cette technique ne semble pas avoir été utilisée pour un essai à concentrations multiples.

Il existe quatre grandes catégories de liquides extraits d'un sédiment en vue d'un essai de toxicité :

1) De l'eau de porosité, c'est-à-dire de l'eau qui remplit les espaces entre les particules et qui pourrait se mêler à l'eau sus-jacente formant le lac, la rivière, l'estuaire, etc. En général, on l'extrait du sédiment par centrifugation ou compression (*cf.* 9.3.2).

2) De l'eau non contaminée utilisée pour obtenir un extrait aqueux des substances contenues dans le sédiment (c.-à-d. un élutriat), par exemple, en l'agitant avec un échantillon.

3) Du diluant Microtox ou de l'eau pure dont la salinité a été ajustée et qui a servi à obtenir un extrait aqueux de la manière décrite au point 2) ci-dessus.

4) Un solvant autre que de l'eau (p. ex., un solvant organique) utilisé pour extraire des substances de l'échantillon de sédiment (Schiewe *et al.*, 1985; True et Heyward, 1990).

On peut analyser les liquides appartenant aux trois premières catégories de la même façon que l'on analyse un échantillon liquide ordinaire, en suivant la méthode de base décrite à la section 4. Il faudrait prêter une attention particulière à toute difficulté créée par la couleur ou la turbidité (*cf.* 4.1.1 et 4.9).

Quant à la quatrième catégorie, à savoir les solvants, on recommande que chacune des cuvettes ait la même teneur en solvant. La teneur en solvant du diluant dont on se servira pour l'essai doit correspondre à la concentration la plus élevée présente dans les liquides à expérimenter. L'effet du solvant, s'il en produit un, devrait alors être le même dans toutes les cuvettes. Une autre méthode consiste à inclure un contrôle renfermant la plus forte concentration de solvant représentée dans l'essai, ainsi qu'un contrôle sans solvant. Il serait souhaitable d'effectuer un essai distinct afin de déterminer la CI_{50} du solvant. Une marche à suivre particulière pour l'essai de solvants organiques figure dans un manuscrit de Microbics (1990), et elle pourrait être intégrée à des guides futurs.

9.2.1 Préparation des solutions d'essai

La composition de «sous-échantillons» de liquides extraits de sédiments (p. ex., des extraits successifs) devrait s'effectuer conformément aux directives de la sous-section 7.2 et aux recommandations d'Environnement Canada (1993). Les sous-échantillons ne devraient pas être composés si l'on voulait déterminer la toxicité relative des extraits successifs. Pour les échantillons présentant une couleur ou une turbidité appréciable, il faudrait suivre la méthode et prendre les précautions prévues à la division 4.1.1 et à la sous-section 4.9. On devrait vérifier le pH et la teneur en oxygène dissous des échantillons par rapport aux limites prévues dans les divisions 4.1.2 et 4.1.3.

Une fois le liquide obtenu, on prépare les concentrations d'essai de la manière habituelle (*cf.* 4.2.2). Comme dans le cas des essais d'effluents, de lixiviats et d'élutriats, on pourrait utiliser une seule concentration (et une solution de contrôle) pour établir si les règlements sont respectés, ou des concentrations multiples pour déterminer la CI_{50} (*cf.* 7.2). On devrait employer les mêmes méthodes d'extraction du liquide et d'analyse pour le sédiment de référence que pour le sédiment à expérimenter.

9.2.2 Eau de dilution

En ce qui concerne les échantillons d'eau douce extraite de sédiments, on devrait suivre la méthode de base (universelle).

Pour les échantillons de sédiments marins ou estuariens, ou d'eau salée extraite de ceux-ci, on pourrait utiliser d'autres méthodes. Si l'extrait est essentiellement composé d'eau de mer, on n'y ajouterait pas de solution *MOAS* avant de l'analyser. Il serait préférable d'utiliser de l'eau de mer non contaminée comme eau de contrôle et de dilution des échantillons. On pourrait également ajuster la salinité du diluant Microtox, au moyen de solution *MOAS*, pour qu'elle corresponde à la salinité de l'échantillon, mais il est moins souhaitable de procéder ainsi.

Si l'eau extraite des sédiments présente une salinité inférieure à celle de l'eau de mer non diluée, c'est-à-dire semblable à celle d'une eau estuarienne, on devrait mesurer sa salinité et l'ajuster à la hausse, au besoin, pour qu'elle atteigne au moins 2 ‰. Si l'échantillon d'eau a une salinité supérieure à 2 ‰ mais inférieure à celle de l'eau de mer non diluée, la salinité du diluant devrait être augmentée pour correspondre à la même valeur. On devrait suivre pour ces manipulations les méthodes décrites à la sous-section 8.3.

9.2.3 Résultats et calculs

Les résultats des essais de liquides dérivés de sédiments devraient être conformes aux options et aux méthodes décrites aux sous-sections 4.5 et 7.5.

9.3 Essai d'une suspension solide-liquide

Une modification particulière de la méthode Microtox, appelée «essai en phase solide», est offerte par Microbics et peut s'appliquer aux sédiments, aux boues, aux sols et aux substances semblables. Étant donné que cette méthode prévoit un contact direct des bactéries avec les matières solides de l'échantillon, on dit qu'elle permet de déterminer la présence de substances toxiques à l'intérieur et à la surface des particules. En fait, on ajoute un liquide au sédiment et les organismes sont mis en présence d'une suspension; cet essai peut donc se comparer en partie à celui d'un extrait aqueux de l'échantillon.

Une version préliminaire de cette méthode a paru au début de 1991 (Microbics, 1991a), et une version plus détaillée a été publiée plus tard dans l'année (Microbics, 1991b). On peut s'attendre à ce que certains détails soient modifiés à mesure que l'on acquiert de l'expérience dans l'exécution des essais; par conséquent, seule la technique générale est présentée ici, et on recommande aux analystes de se procurer les méthodes détaillées exposant les instructions les plus récentes de Microbics.

En résumé, l'essai consiste à mettre en contact les bactéries luminescentes avec des suspensions aqueuses salines du sédiment à diverses concentrations, pendant 20 min. Les matières solides sont retirées par filtrage et l'on garde le liquide pendant 5 min additionnelles. On mesure alors la luminescence du liquide, et l'on estime la CI_{50}.

9.3.1 Appareillage

L'essai est conçu pour être effectué au moyen de l'analyseur de modèle 500, avec traitement informatique des données; on suit donc les méthodes générales de la section 5. Cependant, on peut également effectuer l'essai au moyen de l'analyseur moins récent de modèle 2055.

En plus des pipettes et des cuvettes à fond plat habituelles, des fournitures spéciales sont nécessaires :

- Diluant pour l'essai en phase solide (*Solid-Phase Diluent*);
- Tubes pour l'essai en phase solide (*Solid-Phase Tubes*);
- Colonnes filtrantes pour l'essai en phase solide (*Solid-Phase Filter Columns*).

9.3.2 Préparation de la substance à expérimenter

Après mélange, l'échantillon de sédiment est centrifugé ou comprimé pour enlever l'eau libre (interstitielle)[34] (ASTM, 1991b; Environnement Canada, 1993). On mélange à nouveau les solides avant l'utilisation.

Mettre dans un support dix tubes pour l'essai en phase solide marqués de A1 à A5 et de B1 à B5. Dans le tube B5, placer 400 mg du sédiment préparé par extraction de l'eau.

9.3.3 Mise en route de l'essai

La technique est décrite en détail par Microbics (1991a) pour un essai simple utilisant une série de neuf concentrations et un contrôle; on en fait ici une description sommaire. Des méthodes où l'on utilise plusieurs contrôles, des concentrations en double, etc. sont décrites dans un autre document de Microbics (1991b).

a) Introduire 1,0 mL de solution de reconstitution dans une cuvette dans le puits du réactif.

b) Placer des cuvettes dans les puits A1 à A5, et B1 à B5.

c) Reconstituer une fiole de bactéries de la façon habituelle (*cf.* 4.3.1 *a*)), en utilisant la solution de reconstitution du puits du réactif, puis retourner le réactif reconstitué dans ce puits.

d) Verser le réactif reconstitué dans une bouteille de diluant pour l'essai en phase solide, et bien mélanger.

e) Ajouter 2,0 mL du mélange obtenu à l'étape *d*) à chacun des tubes pour l'essai en phase solide placés sur le support (*cf.* 9.3.2), à l'exception du tube contenant le sédiment.

f) Régler un chronomètre à 20 min et ajouter 4,0 mL du mélange contenant les bactéries obtenu à l'étape *d*) au tube pour l'essai en phase solide B5, qui contient l'échantillon; bien mélanger en agitant et en utilisant une pipette.

g) Transférer 2,0 mL du tube B5 au tube B4, puis 2,0 mL de B4 à B3, et ainsi de suite à B2, B1, A5, A4, A3 et A2, mais pas à A1. Il faut bien mélanger le contenu de chaque tube avant de procéder au transfert. Jeter 2,0 mL du tube A2, de sorte que chaque tube contienne 2,0 mL. La concentration la plus forte de matières solides est de 10 % dans le tube B5, les concentrations décroissant selon une dilution de moitié pour atteindre 0,039 % dans le tube A2 et zéro dans le tube A1.

h) Lorsque les 20 min sont écoulées, filtrer le contenu de chaque tube, l'un après

---

34 On pourrait analyser cette eau en suivant les directives de la sous-section 9.2. Certains laboratoires canadiens qui ont utilisé l'essai Microtox en phase solide indiquent qu'il décèle une toxicité plus grande que ne le fait l'essai Microtox sur de l'eau de porosité extraite par centrifugation (Tay *et al.*, 1991; van der Geest, 1991).

l'autre, en poussant une colonne filtrante à l'intérieur du tube[35]. Commencer par la concentration zéro (A1) et continuer par ordre croissant de concentration en terminant avec B5. Chaque fois, transférer 0,5 mL du filtrat liquide à la cuvette portant le numéro correspondant.

i) Laisser le liquide reposer encore 5 min. Régler l'analyseur, au moyen du bouton *SET*, pour le liquide dans la cuvette A1, qui contient le contrôle, et effectuer la mesure de la bioluminescence. Prendre ensuite les mesures pour le liquide dans les autres cuvettes, en allant de la concentration la plus faible (A2) à la plus forte (B5). Noter les mesures ou les faire enregistrer par l'ordinateur.

j) Répéter l'opération avec le ou les échantillons de sédiment de contrôle ou de référence (sédiment «non contaminé»).

9.3.4 Résultats et calculs

On effectue le calcul de la CI_{50} en utilisant la méthode générale décrite à la sous-section 4.5. Ce calcul est habituellement fait par le programme informatique de Microbics (version 6.0), et l'on vérifie manuellement s'il y a des erreurs et si les valeurs obtenues sont vraisemblables.

Il faudrait souligner certaines caractéristiques de cet essai. Il n'y a pas de «mesure au temps zéro» (I_0) pour chacune des cuvettes. La mesure du contrôle (témoin) est considérée comme étant à la fois la mesure au temps zéro pour chaque concentration et celle du contrôle. Par conséquent, le «rapport du témoin» (*cf.* 4.5 *a*)) est toujours de 1,0 et n'a pas besoin d'être estimé, si les calculs sont faits manuellement. Certaines versions antérieures du programme informatique de Microbics ne prévoyaient qu'une dilution de moitié pour les concentrations, et l'on recommande aux analystes d'utiliser la version 6.0 du programme ou une version plus récente.

---

35 Dans la plupart des cas, on utilisera probablement la méthode normalisée de filtrage de Microbics. On recommande cette technique, qui permettrait de comparer les résultats de différents laboratoires utilisant une méthode uniforme. Cependant, Brouwer *et al.* (1990) signalent que, dans un essai en phase solide, la centrifugation a permis de déceler une toxicité au moins dix fois plus élevée que le filtrage, pour tout diamètre de pore compris entre 0,1 et 8 µm.

Section 10

Procès-verbal de l'essai

Le procès-verbal de l'essai devrait décrire les substances et les méthodes utilisées ainsi que les résultats de l'essai. À partir de ce document, le lecteur devrait être en mesure de savoir si les conditions et les méthodes utilisées rendent les résultats admissibles pour l'utilisation prévue.

On peut citer les méthodes et conditions qui sont communes à une série continue d'essais (p. ex., essais de toxicité courants à des fins de surveillance ou de conformité) et qui sont conformes aux dispositions du présent document; on peut aussi présenter, en annexe, un rapport général définissant le mode opératoire normalisé. Dans les cas où des choix sont possibles, la démarche retenue devrait être précisée. Le rapport général devrait faire état des renseignements méthodologiques énumérés aux sections 10.2 à 10.4. Un rapport particulier énonçant les résultats de l'essai devrait renfermer les renseignements indiqués dans les sections 10.1 et 10.5. Des programmes de surveillance particuliers pourraient exiger la mention de certains éléments d'information dans le procès-verbal de l'essai (p. ex., le mode opératoire et les résultats des essais exigeant un ajustement de la salinité). Les autres détails concernant la réalisation et les résultats de l'essai qui ne sont pas consignés au procès-verbal devraient être versés aux dossiers du laboratoire, de sorte qu'on puisse obtenir les renseignements voulus si une vérification de l'essai s'avère nécessaire.

10.1 Substance à expérimenter

a) Type, source et description de l'échantillon (produit chimique, effluent, lixiviat, élutriat, milieu récepteur, sédiment ou autre substance solide assimilée; lieu et méthode de prélèvement; détails sur la nature, l'aspect et les propriétés de l'échantillon, ainsi que son volume ou son poids).

b) Renseignements sur l'étiquetage ou le codage de la substance à expérimenter.

c) Détails sur les modalités de prélèvement, de transport et de stockage des échantillons (p. ex., échantillon instantané, discontinu ou composite, description du contenant et température de l'échantillon à la réception et pendant le stockage).

d) Identité de la ou des personnes ayant prélevé ou fourni l'échantillon.

e) Date et heure du prélèvement de l'échantillon et du début de l'essai définitif.

f) Toute mesure physico-chimique faite sur l'échantillon (p. ex., concentration du produit chimique, couleur, teneur en matières en suspension).

10.2 Organismes soumis à l'essai

a) Numéro de série ou de lot du réactif bactérien.

b) Date de réception et température de conservation.

10.3 Installations et appareillage

a) Nom et adresse du laboratoire.

b) Nom de la ou des personnes ayant effectué l'essai.

c) Numéro de modèle de l'analyseur et description de tout élément d'appareillage non standard.

10.4 Méthodes et conditions d'essai

a) Brève mention de la méthode utilisée, s'il s'agit d'une méthode normalisée [par exemple, conforme au présent document ou aux guides de Microbics (1988a, 1988b, 1989b)].

b) Teneur en oxygène dissous de l'échantillon à expérimenter, avant et après l'aération initiale, s'il y a lieu. Renseignements sur l'aération des solutions avant l'essai (le cas échéant, indiquer le débit, la durée et le mode d'application).

c) Résultats de toute autre analyse chimique de la solution mère ou des solutions d'essai, et méthodes d'analyse utilisées.

d) Méthode utilisée pour la préparation de la solution mère et des solutions d'essai de produits chimiques.

e) Détails sur tout ajustement de la salinité des échantillons.

f) Détails sur l'échantillonnage et le stockage, si l'on a utilisé de l'eau de mer non contaminée pour diluer les échantillons.

g) Concentrations soumises à l'essai, y compris celles des solutions de contrôle, et nombre de cuvettes pour chaque concentration.

h) Aspect des solutions d'essai et tout changement survenu pendant l'essai.

i) Température observée dans la section d'incubation de l'analyseur de toxicité.

j) pH de l'échantillon et description de tout ajustement du pH.

k) Heure des observations pendant l'essai.

10.5 Résultats de l'essai

a) Résultats de l'essai de détermination de l'ordre de grandeur (s'il y en a eu un).

b) Code utilisé pour identifier l'enregistrement graphique des données, s'il y a lieu.

c) Mesures de la bioluminescence au temps zéro.

d) Pourcentage d'inhibition de la bioluminescence dans chaque solution d'essai (y compris les solutions de contrôle) à chaque observation.

e) Résultats de l'essai de correction photométrique (perte de transmission de la lumière causée par la couleur et les autres propriétés de l'échantillon).

f) CI_{50} et limites de confiance à 95 %, avec la méthode de calcul et les valeurs des variables intermédiaires importantes.

g) CI_{50} et limites de confiance à 95 % pour le ou les produits toxiques de référence, déterminées à moins d'un mois de l'essai ou au moment d'utiliser pour la première fois un nouveau lot de réactif bactérien, et moyenne géométrique (± 2 fois l'écart-type) des résultats obtenus antérieurement au laboratoire pour le ou les mêmes produits.

Références

Abernethy, S.G. et G.F. Westlake. «Guidelines for pH Adjustment of Effluent Samples for Toxicity Testing». ISBN 0-7729-5947-1. Rexdale (Ont.), ministère de l'Environnement de l'Ontario, Direction des ressources en eau, 1989. 11 p.

Alberta. «Microtox Interlaboratory Comparison Study (MICS), Standard Assay Procedure». Vegreville (Alb.), Alberta Environment Centre, Chemistry Division, 1987.

Alberta. «Microtox Assay Procedure». Edmonton (Alb.), Alberta Energy Resource Conservation Board, avril 1986. 13 p.

APHA, AWWA et WPCF [American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation]. «Toxicity Test Methods for Aquatic Organisms». *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 17e édition. Washington, DC, APHA, AWWA et WPCF, 1989.

Ankley, G.T., G.S. Peterson, J.R. Amato et J.J. Jenson. «Evaluation of Sucrose as an Alternative to Sodium Chloride in the Microtox® Assay: Comparison to Fish and Cladoceran Tests with Freshwater Effluents». *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 9, 1990, p. 1305-1310.

ASTM [American Society for Testing and Materials]. «Standard Guide for Conducting 10-day Static Sediment Toxicity Tests with Marine and Estuarine Amphipods». *1991 Annual Book of ASTM Standards*. Philadelphia, PA, ASTM, 1991, E1367-90, p. 1052-1075. (1991a)

ASTM. «Standard Guide for Collection, Storage, Characterization, and Manipulation of Sediments for Toxicity Testing». *1991 Annual Book of ASTM Standards*, Philadelphia, PA, ASTM, 1991, E1391-90, p. 1105-1119. (1991b)

Awong, J., G. Bitton, B. Koopman et J.L. Morel. «Evaluation of ATP Photometer for Toxicity Testing Using Microtox Luminescent Bacterial Reagent». *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 43, 1989, p. 118-122.

Becker, D.S., G.R. Bilyard et T.C. Ginn. «Comparisons Between Sediment Bioassays and Alterations of Benthic Macroinvertebrate Assemblages at a Marine Superfund Site: Commencement Bay, Washington». *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 9, 1990, p. 669-685.

Beckman. «Microtox™ System Operating Manual». Carlsbad, CA, Beckman Instruments, Inc., 1982.

Billington, J.W., G.-L. Huang, F. Szeto, W.Y. Shiu et D. MacKay. «Preparation of Aqueous Solutions of Sparingly Soluble Organic Substances: I. Single-component Systems». *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 7, 1988, p. 117-124.

Blaise, C., R. Van Coillie, N. Bermingham et G. Coulombe. «Comparaison des réponses toxiques de trois indicateurs biologiques (bactéries, algues, poissons) exposés à des effluents de fabriques de pâtes et papiers». *Revue internationale des sciences de l'eau*, vol. 3, 1987, p. 9-17.

BNQ [Bureau de normalisation du Québec]. «Eaux - Détermination de la toxicité, Méthode avec la bactérie bioluminescente *Photobacterium phosphoreum*». NQ 36000-205. Québec (QC), BNQ, 1987. 24 p.

Brouwer, H., T. Murphy et L. McArdle. «A Sediment-contact Bioassay with *Photobacterium phosphoreum*». *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 9, 1990, p. 1353-1358.

Bulich, A.A. «Bioluminescence Assays». *Toxicity Testing Using Microorganisms*, vol. 1. G. Bitton et B.J. Dutka (éd.). Boca Raton, FL, CRC Press, 1986, p. 57-74.

Bulich, A.A., N.W. Greene et D.L. Isenberg. «Reliability of the Bacterial Luminescence Assay for Determination of the Toxicity of Pure Compounds and Complex Effluents. *Aquatic Toxicity and Hazard Assessment: Fourth Conference*. D.R. Branson et K.L. Dickson (éd.). ASTM STP 737. Philadelphia, PA, ASTM, 1981, p. 338-347.

Curtis, C., A. Lima, S.J. Lozano et G.D. Veith. «Evaluation of a Bacterial Bioluminescence Bioassay as a Method for Predicting Acute Toxicity of Organic Chemicals to Fish». *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Fifth Conference*. J.G. Pearson, R.B. Foster et W.E. Bishop (éd.). ASTM STP 766. Philadelphia, PA, ASTM, 1982, p. 170-178.

Dearborn [Dearborn Environmental Consulting Services]. «Characterization of PCF Power Station Combustion Wastes Using Total Organic Halide Analysis and Toxicity Screening Tests». Rapport EPS 3/PG/4. Ottawa (Ont.), Environnement Canada, 1986.

DIN [Deustche Industrie Norm]. «Entwurf. Bestimmung der Hemmwirkung von Abwasser auf die Lichtemission von *Photobacterium phosphoreum*. (Leuchtbakterientest-Abwasser) (L34). Test mit Gefriergetrockneten Bakterien». [Rapport préliminaire. Détermination de l'effet inhibiteur d'effluents sur la bioluminescence de la bactérie *Photobacterium phosphoreum*. (Essai avec des bactéries luminescentes sur des eaux usées) (L34). Essai avec des bactéries lyophilisées]. DIN 38 412 Teil 34. Berlin, Beuth Verlag GmbH, 1989. 15 p.

Dutka, B. «Microtox™ Bioluminescence Bioassay Technique». Rapport manuscrit. Burlington (Ont.), Environnement Canada, Institut national de recherche sur les eaux, 1988. 11 p.

Environnement Canada. «Méthode d'essai biologique : essai de létalité aiguë sur la truite arc-en-ciel». Rapport SPE 1/RM/9. Ottawa (Ont.), Environnement Canada, 1990. 53 p. (1990a)

Environnement Canada. «Méthode d'essai biologique : essai de létalité aiguë sur l'épinoche à trois épines (*Gasterosteus*

aculeatus)». Rapport SPE 1/RM/10. Ottawa (Ont.), Environnement Canada, 1990. 49 p. (1990b)

Environnement Canada. «Méthode d'essai biologique : essai de létalité aiguë sur *Daphnia* spp.». Rapport SPE 1/RM/11. Ottawa (Ont.), Environnement Canada, 1990. 61 p. (1990c)

Environnement Canada. «Document d'orientation sur le contrôle de la précision des essais de toxicité au moyen de produits toxiques de référence». Rapport SPE 1/RM/12. Ottawa (Ont.), Environnement Canada, 1990. 91 p. (1990d)

Environnement Canada. «Méthode d'essai biologique : essai de reproduction et de survie sur le cladocère *Ceriodaphnia dubia*». Rapport SPE 1/RM/21. Ottawa (Ont.), Environnement Canada, 1992. 78 p. (1992a)

Environnement Canada. «Méthode d'essai biologique : essai de croissance et de survie sur des larves de tête-de-boule». Rapport SPE 1/RM/22. Ottawa (Ont.), Environnement Canada, 1992. 72 p. (1992b)

Environnement Canada. «Document d'orientation sur le prélèvement, la manutention, le transport, le stockage et la manipulation de sédiments en vue de leur caractérisation chimique et d'essais de toxicité». Ottawa (Ont.), à paraître en 1993.

EPA [Environmental Protection Agency]. «Acute Toxicity Test for Freshwater Fish. Standard Evaluation Procedure». EPA-540/9-85-006. Washington, DC, EPA, Hazard Evaluation Division, 1985. 12 p.

EPA. «Role of Acute Toxicity Bioassays in the Remedial Action Process at Hazardous Waste Sites». EPA-600-8-87/044. Corvallis, OR, EPA, 1987. 12 p.

EPA. «Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms», 2e édition. EPA-600/4 89/001. [Préparé par C.I. Weber, W.H. Peltier, R.J. Norberg-King, W.B. Horning, F.A. Kessler, J.R. Menkedick, T.W. Neiheisel, P.A. Lewis, D.J. Klemm, W.H. Pickering, E.L. Robinson, J. Lazorchak, L.J. Wymer et R.W. Freyberg.] Cincinnati, OH, EPA, 1989. 248 p. (1989a)

EPA. «Standard Operating Procedure for Microtox® - Effluent Testing Center». Manuscrit, révisé le 3 février 1989. Duluth, MN, National Effluent Toxicity Assessment Center, 1989. 5 p. (1989b)

EPA. «Ecological Assessment of Hazardous Waste Sites: A Field and Laboratory Reference». EPA/600/3-89/013. Corvallis, OR, EPA, 1989. (1989c)

Geisy, J.P. et R.A. Hoke. «Freshwater Sediment Toxicity Bioassessment: Rationale for Species Selection and Test Design». *Journal of Great Lakes Research*, vol. 15, 1989, p. 539-569.

Kaiser, K.L.E. et J.M. Ribo. «*Photobacterium phosphoreum* Toxicity Bioassay. II. Toxicity Data Compilation». *Toxicity Assessment*, vol. 3, 1988, p. 195-237.

Kaiser, K.L.E., K.R. Lum et V.S. Palabrica. «Review of Field Applications of the Microtox Test in Great Lakes and St. Lawrence River Waters». *Water Pollution Research Journal of Canada*, vol. 23, 1988, p. 270-278. (1988a)

Kaiser, K.L.E., J.M. Ribo et K. Kwasniewska. «A Microtox Test Survey of Lake St. Clair Water». *Water Pollution Research Journal of Canada*, vol. 23, 1988, p. 356-359. (1988b)

Krebs, F. «Toxizitätstest mit Gefriergetrockneten Leuchtbakterien». [Essai de toxicité avec des bactéries luminescentes lyophilisées.] Gewässerschutz, Wasser, Abwasser, vol. 63, 1983, p. 173-230.

McCaffrey, L. «The Role of Toxicity Testing in Prosecutions Under Section 14(1)(a) of the *Environmental Protection Act, 1971* and Section 32(1) of the *Ontario Water Resources Act*». *Proceedings of the Fifth Annual Aquatic Toxicity Workshop, Hamilton, Ontario, November 7-9, 1978*. Rapport technique du Service des pêches et des sciences de la mer nº 862. Ottawa (Ont.), Pêches et Environnement Canada, 1979, p. 15-22.

McLeay, D.J. et J.B. Sprague. «Ten-day Test for Sediment Lethality Using Marine or Estuarine Infaunal Amphipods: Review of Literature for Subject-specific Information of Value in Developing Environment Canada's Biological Test Method». Rapport manuscrit préparé pour le Groupe intergouvernemental sur la toxicité aquatique. West Vancouver (C.-B.), McLeay Associates Ltd., 1991. 45 p.

Microbics [Microbics Corporation]. *Microtox Application Notes*. «Rapid Toxicity Screening Method». Nº M101.
«Advantages of Using Several Test Times». Nº M102.
«Protection of Biological Waste Treatment Plants». Nº M103.
«Toxicity Testing of Complex Effluents». Nº M104.
«Toxicity Testing of Hazardous Waste». Nº M105.
«Toxicity Testing of Biomaterials and Medical Devices». Nº M107.
«Toxicity Testing of Groundwater». Nº M108.
«Comments on Extrapolation and Sensitivity with Microtox». Nº M110. Carlsbad, CA, Microbics, 1983.

Microbics. «How to Run a Standard Microtox Test». Nº 555880, 21e version. Carlsbad, CA, Microbics, 1988. 45 p. (1988a)

Microbics. «How to Reduce Microtox Test Data». N° 555881, 2e version. Carlsbad, CA, Microbics, 1988. 46 p. (1988b)

Microbics. «Sucrose Based Microtox Assay Procedure». Microtox Information Sheet M-127, n° 555880-R1. Carlbad, CA, Microbics, 1988. 2 p. (1988c)

Microbics. «Microtox Bibliography». Carlsbad, CA, Microbics, Carlsbad, CA, 1989. 7 p. (1989a)

Microbics. «A Microtox Manual. How to Run Toxicity Tests Using the Microtox® Model 500». Nº 555880-R1. Carlsbad, CA, Microbics, 1989. 41 p. (1989b)

Microbics. «Samples Dissolved in Organic Solvent and Organic Solvent Extracted Samples. Assay Protocol with Samples Dissolved in Organic Solvent». Manuscrit préliminaire non numéroté. Carlsbad, CA, Microbics, 1990. 2 p.

Microbics. «How to Run the Microtox Solid-phase Test for Soil, Sludge and Sediment Samples». Manuscrit non numéroté. Carlsbad, CA, Microbics, 25 janvier 1991. 7 p. (1991a)

Microbics. «Solid-phase Test Protocols». Manuscrit non numéroté. Carlsbad, CA, Microbics, 27 septembre 1991. 49 p. (1991b)

Microbics. «Microtox Manual». Carlsbad, CA, Microbics, janvier 1992. [Nouveau guide pour effectuer les essais Microtox avec l'analyseur de modèle 500.]

Mount, D.I. et L. Anderson-Carnahan. «Methods for Aquatic Organism Toxicity Identification Evaluations, Phase I. Toxicity Characterization Procedures». EPA/600/3-88/034. Duluth, MN, Environmental Protection Agency, 1988.

Mudroch, A. et S.D. Macknight. *CRC Handbook of Techniques for Aquatic Sediments Sampling*. Boca Raton, FL, CRC Press, Inc., 1991. 208 p.

Munkittrick, K.R. et E.A. Power. «An Evaluation of the Sensitivity of Microassays Relative to Trout and Daphnid Acute Lethality Tests». Rapport préparé pour Environnement Canada, Direction générale de la protection de l'environnement, Centre de technologie environnementale de River Road, Ottawa (Ont.). North Vancouver (C.-B.), E.V.S. Consultants, 1989. 76 p.

Munkittrick, K.R., E.A. Power et G.A. Sergy. «The Relative Sensitivity of Microtox®, Daphnid, Rainbow Trout, and Fathead Minnow Acute Lethality Tests». *Environmental Toxicology and Water Quality*, vol. 6, 1991, p. 35-62.

Pastorok, R.A. et D.S. Becker. «Comparative Sensitivity of Bioassays for Assessing Sediment Toxicity in Puget Sound». *Oceans '89, An International Conference Addressing Methods for Understanding the Global Ocean, Sept. 18-21, 1989, Seattle, Washington*. Publication n° 89CH2780-5 de l'IEEE. Marine Technology Society, Oceanic Engineering Society and Institute of Electrical and Electronics Engineers, 1989, p. 431-436.

Qureshi, A.A., R.N. Coleman et J.H. Paran. «Evaluation and Refinement of the Microtox Test for Use in Toxicity Screening». *Toxicity Screening Procedures Using Bacterial Systems*. Toxicology Series, Vol. 1. New York, NY, Marcel Dekkar Inc., 1983, p. 89-188.

Schiewe, M.H., E.G. Hawk, D.I. Actor et M.M. Krahn. «Use of a Bacterial Bioluminescence Assay to Assess Toxicity of Contaminated Marine Sediments». *Journal canadien des sciences halieutiques et aquatiques*, vol. 42, 1985, p. 1244-1248.

Sergy, G. «Recommendations on Aquatic Biological Tests and Procedures for Environment Protection, C&P, DOE».

Edmonton, (Alb.), Environnement Canada, juillet 1987.

Shiu, W.Y., A. Maijanen, A.L.Y. Ng et D. MacKay. «Preparation of Aqueous Solutions of Sparingly Soluble Organic Substances: II. Multicomponent Systems - Hydrocarbon Mixtures and Petroleum Products». *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 7, 1988, p. 125-137.

Slooff, W., J.H. Canton et J.L.M. Hermens. «Comparison of the Susceptibility of 22 Freshwater Species to 15 Chemical Compounds. I. (Sub)acute Toxicity Tests». *Aquatic Toxicology*, vol. 4, 1983, p. 113-128.

Sprague, J.B. «Factors that Modify Toxicity». *Fundamentals of Aquatic Toxicology, Methods and Applications*. G.M. Rand et S.E. Petrocelli (éd.). Washington, DC, Hemisphere Pub. Corp., 1985, p. 124-163.

Strosher, M.T. «A Comparison of Biological Testing Methods in Association with Chemical Analyses to Evaluate Toxicity of Waste Drilling Fluids in Alberta». Calgary (Alb.), Association pétrolière du Canada, 1984.

Tay, K.-L., K.G. Doe, S.J. Wade, D.A. Vaughan, R.E. Berrigan et M.J. Moore. «Biological Effects of Contaminants in Halifax Harbour Sediment». *Comptes rendus du dix-septième Colloque annuel sur la toxicité aquatique, 5-7 novembre 1990, Vancouver, C.-B.* P. Chapman, F. Bishay, E. Power, K. Hall, L. Harding, D. McLeay, M. Nassichuk et W. Knapp (éd.). Rapport technique canadien des sciences halieutiques et aquatiques nº 1774, vol. 1. Ottawa, Pêches et Océans Canada, 1991, p. 383-426.

Thurman, H.V. *Introductory Oceanography*. Columbus, OH, Charles E. Merrill Pub. Co., 1975. 441 p.

True, C.J. et A.A. Heyward. «Relationships Between Microtox Test Results, Extraction Methods, and Physical and Chemical Compositions of Marine Sediment Samples». *Toxicity Assessment*, vol. 5, 1990, p. 29-45.

USP [United States Pharmacopeia, USP Subcommittee on In-vitro Toxicity]. «Application of the Concept of Biological Reactivity to Compendial Tests». *Pharmacopeial Forum*, vol. 15, nº 1, 1989, p. 4804-4810.

van der Geest, S.L. «Microtox Comparison of Fresh and Frozen Sediments from the Phase IV and V Amphipod Studies». Rapport inédit. North Vancouver (C.-B.), Environnement Canada, Conservation et Protection, région du Pacifique et du Yukon, août 1991.

Williams, L.G., P.M. Chapman et T.C. Ginn. «A Comparative Evaluation of Marine Sediment Toxicity Using Bacterial Luminescence, Oyster Embryo and Amphipod Sediment Bioassays». *Marine Environmental Research*, vol. 19, 1986, p. 225-249.

Annexe A

Membres du Groupe intergouvernemental sur la toxicité aquatique*

Gouvernement fédéral
(Environnement Canada)

P.G. Wells
Protection de l'environnement
Dartmouth (N.-É.)

P. Jackman
St. John's (T.-N.)

K.G. Doe
Dartmouth (N.-É.)

W.R. Parker
Dartmouth (N.-É.)

S.J. Wade
Dartmouth (N.-É.)

J.D. Vaughan
Dartmouth (N.-É.)

N. Bermingham
Longueuil (QC)

C. Blaise
Longueuil (QC)

D. St-Laurent
Longueuil (QC)

G. Elliott
Edmonton (Alb.)

R.G. Watts
North Vancouver (C.-B.)

S.G. Yee
North Vancouver (C.-B.)

D.J. Moul
North Vancouver (C.-B.)

K.E. Day
Institut national de recherche sur les eaux
Burlington (Ont.)

A.K. Kwan
Institut national de recherche sur les eaux
Ottawa (Ont.)

C. Boutin
Service canadien de la faune
Ottawa (Ont.)

J. Osborne
Bureau de la gestion des déchets
Ottawa (Ont.)

M. Bonnell
Direction de la santé des écosystèmes
Ottawa (Ont.)

D. MacGregor
Direction des affaires réglementaires et de l'intégration des programmes
Ottawa (Ont.)

R.P. Scroggins
Direction du développement technologique
Ottawa (Ont.)

---

* Au mois de novembre 1992.

G.A. Sergy
Direction du développement technologique
Edmonton (Alb.)

Gouvernement fédéral
(Pêches et Océans Canada)

R. Stevens
Direction de l'océanographie et des contaminants
Ottawa (Ont.)

Gouvernements provinciaux

C. Bastien
Ministère de l'Environnement du Québec
Sainte-Foy (QC)

S.G. Abernethy
Ministère de l'Environnement de l'Ontario
Rexdale (Ont.)

C.M. Neville
Ministère de l'Environnement de l'Ontario
Rexdale (Ont.)

D.G. Poirier
Ministère de l'Environnement de l'Ontario
Rexdale (Ontario)

I.R. Smith
Ministère de l'Environnement de l'Ontario
Toronto (Ont.)

G.F. Westlake (président)
Ministère de l'Environnement de l'Ontario
Rexdale (Ont.)

B. Bayer
Ministère de l'Environnement du Manitoba
Winnipeg (Manitoba)

J. Somers
Alberta Environmental Centre
Vegreville (Alb.)

K. Smiley
Alberta Environmental Centre
Vegreville (Alb.)

S.H. Horvath
Ministère de l'Environment de la Colombie-Britannique
Vancouver (C.-B.)

G. van Aggelen
Ministère de l'Environnement de la Colombie-Britannique
North Vancouver (C.-B.)

Annexe B

Adresses de l'Administration centrale et des bureaux régionaux de Conservation et Protection

Administration centrale
351, boulevard Saint-Joseph
Place Vincent-Massey
Hull (Québec)
K1A 0H3

Région de l'Atlantique
15e étage, Queen Square
45, promenade Alderney
Dartmouth (Nouvelle-Écosse)
B2Y 2N6

Région du Québec
1141, route de l'Église
C.P. 10100
Sainte-Foy (Québec)
G1V 4H5

Région de l'Ontario
25, avenue St. Clair est, 6e étage
Toronto (Ontario)
M4T 1M2

Région de l'Ouest et du Nord
Twin Atria no 2, pièce 210
4999, 98e avenue
Edmonton (Alberta)
T6B 2X3

Région du Pacifique et du Yukon
224, rue Esplanade
North Vancouver (C.-B.)
V7M 3J7

Annexe C

Exemple de format possible pour la présentation des résultats des essais Microtox*

N° D'ÉCHANTILLON S.O. PRÉLEVÉ PAR K.W.

DATE 90 10 22

SOURCE $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ - Réactif Baker HEURE 10 00

RÉSULTATS TOXIQUE ☑ NON TOXIQUE ☐ γ MAX. S.O. POUR LA CONCENTRATION S.O.

GRAPHIQUE ☑

CALCULATRICE ☐ CI ____ (____ min ____ °C) ____ ☐ % D'ÉCHANTILLON ☐ mg/L

FACTEUR DE CONFIANCE ____ ☐ AUTRE ____

LIMITES DE CONFIANCE ____ À ____

COMMENTAIRES ____

DONNÉES SUR L'ÉCHANTILLON TYPE (EFFLUENT, LIXIVIAT, ETC.) Produit chimique purifié

DATE DE L'ESSAI 90 . 10 . 22 HEURE ____

COULEUR Aucune CORRECTION REQUISE OUI ☐ NON ☑

TURBIDITÉ Aucune SÉPARATION REQUISE OUI ☐ NON ☑

pH INITIAL 5,6 pour 1% pH AJUSTÉ À S.O. AVEC S.O.

AJUSTEMENT DE LA PRESSION OSMOTIQUE MOAS ☐ NaCl ☑ AUTRE ☐ ____

PREMIÈRE DILUTION DE L'ÉCHANTILLON 1%, dilution au 1/50

ANALYSTE K.W. N° DE LOT DU RÉACTIF M- 101289

COMMENTAIRES Pour obtenir la concentration en mg Zn^{++}/L, multiplier la CI par 65,4 ÷ 287,4

TABLEAU DES RÉSULTATS OBSERVÉS ET CALCULÉS

CUVETTE TÉMOIN	CONCENTRATION - ESSAI DÉFINITIF (PRÉCISER L'UNITÉ DE MESURE)	MESURE INITIALE I (0)	MESURES FINALES 5 min I (5)	15 min I (15)	30 min I (30)
B1	0 (TÉMOIN)	90,3	79,2	72,3	61
C1	0 (TÉMOIN)	88,5	77,9	71,5	60,3
SOMME DES MESURES		178,8 [A]	157,1 [B]	143,8 [B]	121,3 [B]
MOYENNE DES RAPPORTS DES TÉMOINS [B] ÷ [A] = $\bar{R}$ (t) =			$\bar{R}$ (5) = 0,8786	$\bar{R}$ (15) = 0,8038	$\bar{R}$ (__) = 0,6784

RAPPORT DU TÉMOIN
B1 : R (5) = 0,8771
C1 : R (5) = 0,8802

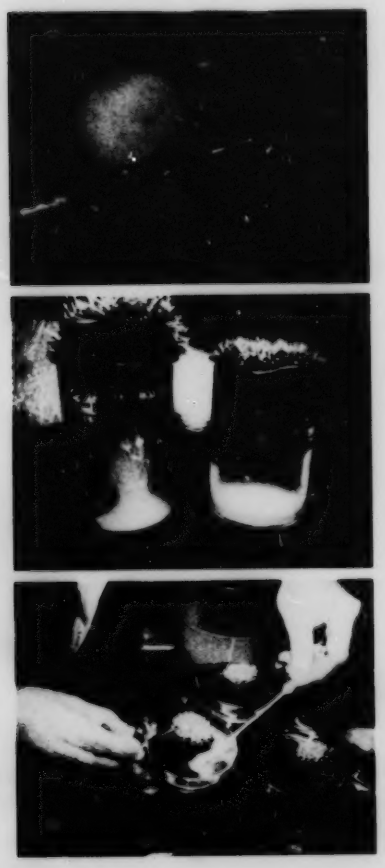
CORRECTION DE L'ABSORBANCE (COULEUR)
I₀ = S.O.
I = S.O.
C = S.O.

CUVETTE D'ÉCHANTILLON	CONCENTRATION - ESSAI DÉFINITIF (PRÉCISER L'UNITÉ DE MESURE)	MESURE INITIALE I (0) [C]	MESURES FINALES 5 min I (5) [D]	15 min I (15) [D]	30 min I (30) [D]	γ - EFFETS (t, T) γ (5)	γ (15)	γ (30)	γ °C (__)
B2	3,7 mg/L	90	68,7	57,1	46,7	0,1511	0,2676	0,3074	
C2	3,7	87,1	66,8	54,9	43,4	0,1456	0,2760	0,3615	
B3	11,1	90,2	63,3	36,4	15,7	0,2520	0,9930	2,898	
C3	11,1	85,8	61,1	34,4	15,1	0,2388	1,006	2,855	
B4	33,3	85,9	46,5	13,6	4,2	0,6231	4,080	12,88	
C4	33,3	90	47	14,0	5,0	0,6825	4,170	11,21	
B5	100	81,4	24,8	4,8	1,6	1,884	12,64	33,51	
C5	100	85,1	24,9	5,0	1,8	2,003	12,69	31,07	
CI 50 (t __ min, T 15 °C)			GRAPHIQUE			50,0	11,0	4,4	
			CALCULATRICE						

* D'après Beckman (1982).

IMPRIMÉ AU CANADA

Série de la Protection de l'environnement



Méthode d'essai biologique : essai sur la fécondation chez les échinides (oursins verts et oursins plats)

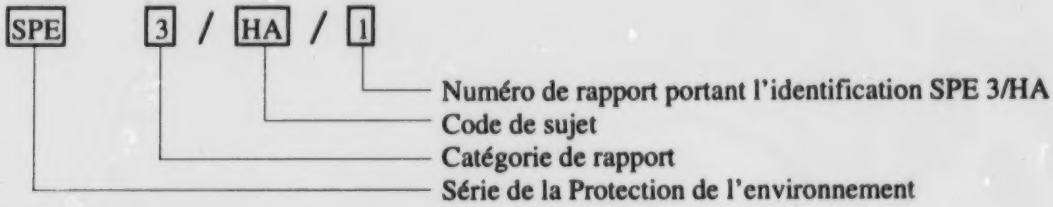
Rapport SPE 1/RM/27
Décembre 1992

Canada

Environnement Canada | Environment Canada

SÉRIE DE LA PROTECTION DE L'ENVIRONNEMENT

Exemple de numérotation :



Catégories

1 Règlements/Lignes directrices/ Codes de pratiques
2 Évaluation des problèmes et options de contrôle
3 Recherche et développement technologique
4 Revues de la documentation
5 Inventaires, examens et enquêtes
6 Évaluations des impacts sociaux, économiques et environnementaux
7 Surveillance
8 Propositions, analyses et énoncés de principes généraux
9 Guides

Sujets

AG Agriculture
AN Technologie anaérobie
AP Polluants atmosphériques
AT Toxicité aquatique
CC Produits chimiques commerciaux
CE Consommateurs et environnement
CI Industries chimiques
FA Activités fédérales
FP Traitement des aliments
HA Déchets dangereux
IC Chimie inorganique
MA Pollution marine
MM Exploitation minière et traitement des minéraux
NR Régions du Nord et rurales
PF Papier et fibres
PG Production d'électricité
PN Pétrole et gaz naturel
RA Réfrigération et climatisation
RM Méthodes de référence
SF Traitements de surface
SP Déversements de pétrole et de produits chimiques
SRM Méthodes de référence normalisées
TS Systèmes de transport
TX Textiles
UP Pollution urbaine
WP Protection/préservation du bois

Des sujets et des codes additionnels sont ajoutés au besoin. On peut obtenir une liste des publications de la SPE en s'adressant aux Publications de la Protection de l'environnement, Conservation et Protection, Environnement Canada, Ottawa (Ontario) K1A 0H3.

Printed on recycled paper

Imprimé sur du papier recyclé

Méthode d'essai biologique : essai sur la fécondation chez les échinides (oursins verts et oursins plats)

Protection de l'environnement
Conservation et Protection
Environnement Canada

Rapport SPE 1/RM/27
Décembre 1992

DONNÉES DE CATALOGAGE AVANT PUBLICATION (CANADA)

Vedette principale au titre:

Méthode d'essai biologique. Essai sur la fécondation chez les échinides (oursins verts et oursins plats)

(Rapport ; SPE 1/RM/27)
Publ. aussi en anglais sous le titre: Biological test method. Fertilization assay using echinoids (sea urchins and sand dollars).
Comprend des références bibliographiques.
ISBN 0-662-98166-9
N° de cat. MAS En49-24/1-27F

1. Échinides -- Toxicité -- Tests.
2. Clypéastroïdes -- Toxicité -- Tests.
3. Hydrobiologie -- Aspect de l'environnement.

I. Canada. Direction générale de la protection de l'environnement. II. Canada. Environnement Canada. III. Titre: Essai sur la fécondation chez les échinides (oursins verts et oursins plats). IV. Coll.: Rapport (Canada. Environnement Canada) ; SPE 1/RM/27.

QL384.E2B5614 1993 593.9'5 C93-09988-4

© Ministre des Approvisionnements et Services Canada 1993
No de catalogue En 49-24/1-27F
ISBN 0-662-98166-9
IMPRIMERIE BEAUREGARD LIMITÉE

Commentaires

Les personnes qui désirent faire part de leurs commentaires sur la teneur du présent rapport sont priées de les adresser à :

M. Richard Scroggins
Direction du développement technologique
Environnement Canada
Ottawa (Ontario)
K1A 0H3

M. Gary Sergy
Direction du développement technologique
Environnement Canada
4999, 98^{e} avenue, pièce 210
Edmonton (Alberta)
T6B 2X3

This report is also available in English under the title *Biological Test Method: Fertilization Assay Using Echinoids (Sea Urchins and Sand Dollars)*. For copies, please contact:

Environmental Protection Publications
Conservation and Protection
Environment Canada
Ottawa, Ontario
K1A 0H3

Résumé

Le présent document expose les méthodes recommandées par Environnement Canada en vue de l'exécution d'un essai de toxicité sublétale en milieu marin sur les gamètes d'oursins verts ou d'oursins plats. Dans le cadre de cet essai, on expose d'abord le sperme à la substance étudiée. On ajoute ensuite des oeufs et on mesure le taux de fécondation, tout en maintenant l'exposition à une concentration constante de la substance étudiée. On obtient comme résultat une diminution du taux de fécondation que l'on exprime par la concentration estimée de la substance étudiée causant un pourcentage précis d'inhibition (CI_p), ou par la concentration minimale avec effet observé (CMEO) et par la concentration sans effet observé (CSEO). L'essai demande peu de temps et compte parmi les essais de toxicité sublétale en milieu marin les plus sensibles. La survie des gamètes et le succès de la fécondation étant des éléments essentiels du cycle de vie, cet essai constitue un instrument de mesure puissant et significatif de la sublétalité. On peut utiliser, dans le cadre de cet essai, cinq concentrations de la substance étudiée afin de déterminer la concentration seuil, ou encore une seule concentration, comme dans les essais réglementaires ou à résultat unique.

*Pour cet essai, on recommande d'utiliser les espèces suivantes : l'oursin vert (*Strongylocentrotus droebachiensis*) que l'on trouve sur les côtes atlantique, pacifique et arctique du Canada, l'oursin violet du Pacifique (*S. purpuratus*) ou le clypéaster excentrique (*Dendraster excentricus*) qui vit dans le Pacifique. Dans la mesure où elles satisferaient aux exigences relatives à la validité des essais, on peut également utiliser d'autres espèces locales ou encore des espèces d'autres pays si l'on obtient un permis d'importation. Parmi les espèces que l'on peut importer, mentionnons l'oursin violet de l'Atlantique (*Arbacia punctulata*) et l'oursin blanc de Californie (*Lytechinus pictus*).*

Ce rapport présente également les méthodes permettant de conserver des échinides adultes en laboratoire et d'obtenir le sperme et les oeufs nécessaires à un essai. On y indique également les conditions et méthodes générales ou universelles qui doivent être mises en oeuvre pour réaliser des essais sur un large éventail de substances. D'autres conditions et méthodes sont propres à l'évaluation d'un ou de plusieurs échantillons de produits chimiques, d'effluents, de milieux récepteurs, de lixiviats, d'élutriats ou de liquides provenant de sédiments et de substances solides

similaires. Le lecteur y trouvera des directives concernant les installations d'essai, la manipulation et le stockage d'échantillons, la préparation de solutions d'essai et la mise en route d'essais, les conditions d'essai particulières, les observations et mesures appropriées, les résultats d'essais, les méthodes de calcul et la validation de l'essai.

Abstract

Methods recommended by Environment Canada for performing a sublethal marine toxicity test using gametes obtained from sea urchins or sand dollars are described in this report. In the test, sperm are exposed to the substance being tested. Eggs are then added, and the success of fertilization under continued exposure to the same concentration of test substance is measured. The endpoint is decreased success of fertilization, described in terms of the concentration estimated to cause a specified percent inhibition (ICp), or the lowest-observed-effect concentration (LOEC) and no-observed-effect concentration (NOEC). The test is quick and is among the most sensitive of marine sublethal toxicity tests. Because the gametes and the success of fertilization usually represent a sensitive part of the life cycle, this assay should be considered as a powerful and meaningful sublethal test. The test may be run with five concentrations of test substance to determine the threshold of effect, or with one concentration as a regulatory or pass/fail test.

*Recommended species for use in this test are the green sea urchin (*Strongylocentrotus droebachiensis*) found on the Atlantic, Pacific and Arctic coasts of Canada, the Pacific purple sea urchin (*S. purpuratus*), or the eccentric sand dollar (*Dendraster excentricus*) from the Pacific. Provided that requirements for test validity are met, other local species may be used, or species from other geographic locations if a permit can be obtained to bring in specimens. Possible species to import include the Atlantic purple sea urchin commonly called Arbacia (*Arbacia punctulata*), and the white sea urchin from California (*Lytechinus pictus*).*

Procedures are given for holding adult echinoids in the laboratory, and obtaining sperm and eggs for a test. General or universal conditions and procedures are outlined for testing a variety of substances. Additional conditions and procedures are specific for testing sample(s) of chemical, effluent, receiving water, leachate, elutriate, or liquid derived from sediment or similar solid substance. Instructions are included for test facilities, handling and storing samples, preparing test solutions and initiating tests, specific test conditions, appropriate observations and measurements, endpoints and methods of calculation, and validation of the test.

Avant-propos

Le présent document fait partie d'une série de **méthodes recommandées** *pour mesurer et évaluer les effets bioaquatiques de substances toxiques. Ces méthodes ont été évaluées par Conservation et Protection et sont recommandées pour les applications suivantes :*

- *utilisation dans les laboratoires de toxicité aquatique de Conservation et Protection;*
- *essais confiés à des entrepreneurs par Environnement Canada ou demandés à des organismes ou à des entreprises de l'extérieur;*
- *remplacement d'instructions plus précises, comme celles prévues dans des règlements;*
- *fondement pour l'établissement d'instructions très explicites pouvant être requises dans un programme de réglementation ou une méthode de référence normalisée.*

Les différents types d'essais compris dans cette série ont été choisis parce qu'ils étaient acceptables aux fins des programmes de protection et de gestion de l'environnement mis en oeuvre par Environnement Canada. Ces documents visent à fournir des lignes directrices et à faciliter l'utilisation de méthodes cohérentes, pertinentes et exhaustives pour recueillir des données sur les effets toxiques d'échantillons de produits chimiques, d'effluents, de lixiviats, d'élutriats, de milieux récepteurs et de sédiments ou de solides assimilés.

Dans le présent document, la mention d'appellations commerciales ne constitue nullement une recommandation de la part d'Environnement Canada; d'autres produits de valeur semblable peuvent être utilisés.

Table des matières

Résumé v
Abstract vii
Avant-propos viii
Liste des tableaux xii
Liste des figures xii
Liste des abréviations et des formules chimiques xiii
Glossaire xv
Remerciements xxiii

Section 1
Introduction 1
1.1 Contexte 1
1.2 Caractéristiques générales et utilisation des échinides dans des essais 1

Section 2
Organismes soumis à l'essai 9
2.1 Espèces 9
2.2 Stades de développement, taille et origine des organismes 10
2.3 Conservation d'adultes en laboratoire 12
2.3.1 Généralités 12
2.3.2 Réservoirs de garde des échinides 12
2.3.3 Éclairage 13
2.3.4 Eau 13
2.3.5 Température 16
2.3.6 Oxygène dissous 17
2.3.7 pH 17
2.3.8 Alimentation 17
2.3.9 Nettoyage des réservoirs 18
2.3.10 Maladies et mortalité 18

Section 3
Système d'essai 20
3.1 Installations et appareils 20
3.2 Éclairage 20
3.3 Récipients contenant les solutions d'essai 20
3.4 Eau de contrôle/de dilution 21

Section 4
Méthodes d'essai universelles 23
4.1 Préparation des solutions d'essai 23
4.1.1 Eau de contrôle/de dilution 24
4.1.2 Concentrations 28

4.1.3 Répétition de l'essai 29
4.1.4 Contrôles 30
4.2 Mise en route et réalisation de l'essai 30
4.2.1 Collecte des gamètes en vue de l'essai 31
4.2.2 Préparation de suspensions types de gamètes 33
4.2.3 Rapport spermatozoïdes:oeuf 36
4.2.4 Exposition des gamètes 37
4.3 Conditions de l'essai 39
4.3.1 Température 40
4.3.2 Salinité 40
4.3.3 Oxygène dissous et aération 41
4.3.4 pH 42
4.4 Observations et mesures 44
4.5 Résultats et calculs 44
4.5.1 Validité de l'essai 44
4.5.2 Concentration sans effet observé 46
4.5.3 Concentration inhibitrice 47
4.5.4 Autres plans et objets d'essai 49
4.6 Produits toxiques de référence 49
4.7 Considérations juridiques 52

Section 5
Méthodes particulières pour l'essai de produits chimiques 53
5.1 Propriétés, étiquetage et stockage de l'échantillon . . . 53
5.2 Préparation des solutions d'essai 53
5.3 Eau de contrôle/de dilution 54
5.4 Observations et mesures 55
5.5 Résultats et calculs 55

Section 6
Méthodes particulières pour l'essai d'échantillons d'effluents, d'élutriats et de lixiviats 56
6.1 Prélèvement, étiquetage, transport et stockage des échantillons 56
6.2 Préparation des solutions d'essai 57
6.3 Eau de contrôle/de dilution 57
6.4 Observations et mesures sur les échantillons 58
6.5 Résultats et calculs 59

Section 7
Méthodes particulières pour l'essai d'échantillons de milieux récepteurs 60
7.1 Prélèvement, étiquetage, transport et stockage des échantillons 60
7.2 Préparation des solutions d'essai 60
7.3 Eau de contrôle/de dilution 60

7.4 Observations et mesures sur les échantillons **61**
7.5 Résultats et calculs **61**

Section 8
Méthodes particulières pour l'essai d'échantillons de sédiments et de solides assimilés **62**
8.1 Généralités **62**
8.1.1 Étiquetage, transport et stockage des échantillons . . . **63**
8.1.2 Préparation de l'échantillon **63**
8.1.3 Observations et mesures sur les échantillons **63**
8.1.4 Sédiments de contrôle ou de référence **64**
8.2 Essai de liquides provenant des sédiments et des solides assimilés **64**
8.2.1 Préparation des solutions d'essai **65**
8.2.2 Eau de contrôle/de dilution **65**
8.2.3 Résultats et calculs **66**

Section 9
Procès-verbal de l'essai **67**
9.1 Substance à expérimenter **67**
9.2 Organismes soumis à l'essai **67**
9.3 Installations et appareils **68**
9.4 Eau de contrôle/de dilution **68**
9.5 Méthode d'essai **68**
9.6 Conditions de l'essai **68**
9.7 Résultats de l'essai **69**

Références **70**

Annexe A
Membres du Groupe intergouvernemental sur la toxicité aquatique **79**

Annexe B
Adresses de l'Administration centrale et des bureaux régionaux de Conservation et Protection **81**

Annexe C
Examen des différentes méthodes employées par des chercheurs dans les essais antérieurs de fécondation chez les oursins et les clypéasters **83**

Annexe D
Bibliographie. Documents supplémentaires se rapportant directement à l'essai canadien sur la fécondation chez les échinides **101**

Annexe E
Série logarithmique de concentrations convenant aux essais toxicologiques **109**

Liste des tableaux

1 Caractéristiques générales et utilisation des échinides dans les essais 11

2 Liste de contrôle des conditions et des méthodes recommandées pour la garde des échinides 14

3 Liste de contrôle des conditions et méthodes recommandées 25

4 Tableau récapitulatif des quantités de sperme et d'oeufs à ajouter à chaque récipient d'essai pour les trois volumes d'essai 35

Liste des figures

1 Schéma de la démarche adoptée pour définir les conditions et méthodes d'essai adaptées à différents types de substances 2

2 Caractéristiques générales des échinides 4

3 Caractéristiques distinctives des oeufs fécondés et non fécondés 45

Liste des abréviations et des formules chimiques

°C . . . . . degré Celsius

CI_p . . . . . concentration inhibitrice pour un pourcentage d'effet donné

cm . . . . . centimètre

CMEO . . . . concentration minimale avec effet observé

CSE . . . . . concentration seuil d'effet

CSEO . . . . concentration sans effet observé

d . . . . . jour

DSM . . . . . différence significative minimale

EIT . . . . . Évaluation d'identification de la toxicité

g . . . . . gramme

g/kg . . . . . gramme par kilogramme

h . . . . . heure

HCl . . . . . acide chlorhydrique

H_2O . . . . . eau

L . . . . . litre

m . . . . . mètre

MC . . . . . marque de commerce

mg . . . . . milligramme

min . . . . . minute

mL . . . . . millilitre

mm . . . . . millimètre

mS . . . . . millisiemens

N . . . . . normal

NaOH . . . . hydroxyde de sodium

OD . . . . . oxygène dissous (concentration)

SI . . . . . Système international d'unités

sp. . . . . espèce

µg . . . . . microgramme

µm . . . . . micromètre

> . . . . . supérieur à

< . . . . . inférieur à

≥ . . . . . supérieur ou égal à

≤ . . . . . inférieur ou égal à

± . . . . . plus ou moins

% . . . . . pour cent

Glossaire

Remarque : Toutes les définitions ci-après se rapportent aux méthodes énoncées dans le présent rapport; il se pourrait qu'elles ne soient pas adaptées à d'autres contextes.

Verbes auxiliaires

L'auxiliaire *doit (doivent)* est utilisé pour exprimer une obligation absolue.

L'auxiliaire *devrait (devraient)* et le conditionnel d'obligation *(il faudrait, etc.)* sont utilisés pour indiquer que la condition ou la méthode en cause est recommandée et doit être respectée dans la mesure du possible.

L'auxiliaire *peut (peuvent)* indique qu'on est autorisé à faire une chose ou en mesure de la faire; il indique également qu'un phénomène est susceptible de se produire.

Termes techniques généraux

Acclimatation - Adaptation physiologique à un niveau précis d'une ou de plusieurs variables environnementales, par exemple, la température ou la salinité. Ce terme se rapporte généralement à des conditions contrôlées en laboratoire.

Conductivité - Expression numérique de la capacité d'une solution aqueuse de transporter un courant électrique. Cette capacité dépend de la concentration, de la valence et de la mobilité des ions en solution, ainsi que de la température de la solution. La conductivité des eaux douces s'exprime normalement en millisiemens par mètre (unité SI) ou en micromhos par centimètre (1 mS/m = 10 µmho/cm). La conductivité est une méthode normalisée de mesure de la salinité (*cf.* ce terme), le résultat étant normalement exprimé en grammes par kilogramme (g/kg) ou en parties par millier.

Conformité - Fait de respecter les exigences du gouvernement en matière de réglementation ou de délivrance de permis.

Différence significative minimale (DSM) - Différence entre les résultats des groupes étudiés (dans le présent essai, la différence entre les pourcentages moyens de fécondation) qui devrait exister pour que l'on puisse conclure à une différence significative entre les groupes. On obtient la DSM par les essais à comparaisons multiples de Dunnett, une méthode statistique normalisée.

Dispersant - Substance chimique qui réduit la tension superficielle entre l'eau et une substance hydrophobe (p. ex., du pétrole), ce qui facilite la dispersion de cette substance dans l'eau sous forme d'émulsion.

Embryon - Jeune animal non développé, avant son éclosion de l'oeuf.

Émulsifiant - Substance chimique qui facilite le mélange fin (sous forme de minuscules gouttelettes), dans l'eau, d'une substance normalement hydrophobe.

Euryhalin - Se dit d'un animal aquatique qui peut tolérer de grandes variations de la salinité sans subir de stress.

Floculation - Formation d'un précipité léger (floc) en suspension dans une solution.

Gamète - Oeuf non fécondé ou sperme obtenu d'un animal adulte.

Larve - Animal récemment éclos dont les caractéristiques physiques diffèrent de celles observées chez l'adulte de la même espèce.

pH - Logarithme négatif de l'activité des ions d'hydrogène mesurée par leur concentration en moles par litre. Cette valeur exprime le degré ou l'intensité des réactions acides et alcalines selon une échelle de 0 à 14, où le nombre 7 représente la neutralité et les nombres inférieurs correspondent, en ordre décroissant, à des réactions acides de plus en plus fortes; et les nombres supérieurs à 7 indiquent, en ordre croissant, des réactions basiques ou alcalines de plus en plus fortes.

Photopériode - Durée d'éclairage et d'obscurité au cours d'un cycle de 24 h.

Pourcentage (%) - Concentration exprimée en parties par centaine. Un pour cent représente une unité ou partie d'une substance (p. ex., effluent, élutriat, lixiviat ou milieu récepteur) diluée dans l'eau, jusqu'à concurrence de 100 parties. On peut préparer des concentrations en volume (*V/V*) ou en masse (*m/m*). On les exprime en pourcentage de la substance à expérimenter dans la solution finale.

Précipitation - Formation d'un solide (précipité) à partir d'une solution.

Prétraitement - Dans le présent rapport, traitement d'un échantillon ou sa dilution, préalable à l'exposition des gamètes.

Salinité - Quantité totale, en grammes, de solides dissous dans 1 kg d'eau. Elle se détermine après conversion de tous les carbonates

en oxydes, après remplacement de tous les bromures et iodures par des chlorures et après oxydation de toutes les matières organiques. La salinité peut aussi se mesurer directement grâce à un salinimètre/conductimètre ou par d'autres moyens (APHA *et al.*, 1989). Elle s'exprime habituellement en grammes par kilogramme (g/kg) ou en parties par millier (‰), qui en représentent un équivalent approximatif.

Surveillance - Activités de vérification de la qualité ou de collecte et de communication de données, effectuées de façon régulière (p. ex., quotidienne, hebdomadaire, mensuelle ou trimestrielle). Dans le contexte du présent rapport, ce terme s'applique soit à la vérification et à la mesure périodiques de certaines variables biologiques ou relatives à la qualité de l'eau, soit au prélèvement et à l'essai d'échantillons d'effluents, de lixiviats, d'élutriats ou de milieux récepteurs marins ou estuariens pour la mesure de leur toxicité.

Turbidité - Degré de réduction de la clarté de l'eau par la présence de matières en suspension ou autres qui entraînent la diffusion et l'absorption de la lumière, plutôt que sa transmission en ligne droite dans l'échantillon. La turbidité s'exprime généralement en unités de turbidité néphélémétrique.

Termes désignant les substances utilisées au cours des essais

Contrôle - Traitement reproduisant l'ensemble des conditions et facteurs qui pourraient influencer les résultats d'une enquête ou d'une étude, à l'exception de la condition particulière faisant l'objet de cette étude. Dans un essai de toxicité aquatique, le contrôle doit reproduire toutes les conditions du ou des traitements d'exposition, sans porter sur la substance à expérimenter. Le contrôle est utilisé pour établir l'absence de toxicité mesurable en raison des conditions de base de l'essai (p. ex., qualité de l'eau de dilution, santé des organismes soumis à l'essai ou effets attribuables à leur manipulation).

Eau d'amont - Eau de mer naturelle (p. ex., provenant d'un estuaire ou d'un milieu marin) qui n'est pas soumise à l'influence de l'effluent (ou de toute autre substance d'essai), du fait qu'elle se trouve contre le courant ou assez loin perpendiculairement à celui-ci.

Eau déchlorée - Eau chlorée (généralement, eau potable municipale) ayant subi un traitement visant à en éliminer le chlore et ses composés.

Eau de contrôle/de dilution - Eau utilisée pour le contrôle, pour diluer la substance à expérimenter ou pour l'une et l'autre de ces fins.

Eau de dilution - Eau de mer ou eau saline utilisée pour diluer la substance à expérimenter afin d'obtenir différentes concentrations pour les divers traitements associés aux essais de toxicité.

Eau de mer reconstituée - Eau douce à laquelle on ajoute la quantité nécessaire de sel de mer, en vente dans le commerce, pour atteindre la salinité (et le pH) souhaité pour les essais.

Eau de porosité - Eau entourant les particules d'un sédiment. La quantité d'eau interstitielle s'exprime en pourcentage en poids du sédiment humide.

Eau désionisée - Eau qu'on a purifiée pour en extraire les ions en la faisant circuler dans des colonnes de résine ou dans un système d'osmose inverse.

Eau distillée - Eau qu'on a traitée au moyen d'un appareil de distillation (au verre borosilicaté ou autre) pour en éliminer les impuretés.

Eau estuarienne - Eau saumâtre des parties côtières des océans résultant de la dilution mesurable de l'eau de mer par l'eau douce apportée par les cours d'eau.

Eau marine - Eau de mer qui se trouve ou qui est prélevée dans l'océan, dans la mer ou près des côtes, à un endroit où elle n'a pas subi de dilution appréciable par l'eau douce naturelle apportée par les cours d'eau.

Eaux usées - Terme général englobant les effluents, les lixiviats et les élutriats.

Effluent - Tout déchet liquide (p. ex., industriel ou urbain) rejeté dans l'environnement aquatique.

Élutriat - Solution aqueuse obtenue après avoir ajouté de l'eau à un déchet solide (p. ex., sédiments, stériles ou boues de forage ou de dragage), avoir agité le mélange, puis l'avoir centrifugé ou filtré ou avoir décanté le surnageant.

Lixiviat - Eau ou eau usée ayant traversé une colonne de sol ou de déchets solides dans l'environnement.

Milieu récepteur - Eau de mer naturelle (p. ex., d'un estuaire ou d'un milieu marin) qui a reçu un rejet de déchets ou qui est sur le point d'en recevoir un (p. ex., immédiatement en amont du point de rejet). D'autres termes doivent être employés afin de préciser le sens de ce terme dans son contexte.

Produit chimique - Dans le présent rapport, se dit de tout élément, composé, formule ou mélange de substances chimiques qui pourrait se retrouver dans l'environnement aquatique par déversement, application ou rejet. Les insecticides, les herbicides, les fongicides, les larvicides employés contre la lamproie marine et les agents de traitement des déversements de pétrole sont des exemples de produits chimiques qui se retrouvent dans l'environnement.

Produit toxique de référence - Produit chimique étalon utilisé pour mesurer la sensibilité des organismes soumis à l'essai afin d'établir les limites de confiance des données de toxicité recueillies sur une substance à expérimenter. Dans la plupart des cas, on procède à un essai de toxicité sur un produit toxique de référence afin d'évaluer la sensibilité des organismes au moment de l'étude d'une substance à expérimenter, ainsi que la précision des résultats obtenus par le laboratoire pour ce produit.

Saumure - Solution de sel de mer et d'eau dont la concentration est plus élevée que celle de l'eau de mer. On peut l'obtenir en congelant partiellement de l'eau de mer filtrée et en récupérant le liquide qui n'est pas gelé, en la congelant pour ensuite la dégeler partiellement ou encore, par évaporation, en la chauffant lentement. On peut également préparer la saumure en ajoutant du sel de mer, en vente dans le commerce, à de l'eau douce ou à de l'eau distillée. La concentration de la saumure utilisée dans cet essai sur la fécondation devrait être de 60 à 90 g/kg.

Sédiment - Substance formée de particules normalement déposée au fond de l'eau ou formulée à des fins expérimentales.

Sédiment de contrôle - Sédiment essentiellement libre de contaminant utilisé couramment lors de l'évaluation de l'acceptabilité des essais.

Sédiment de référence - Sédiment prélevé sur le terrain et choisi pour certaines de ses caractéristiques qui sont identiques à celles du sédiment utilisé pour les essais, notamment la taille de ses particules, sa compacité et sa teneur en matière organique. Il doit toutefois être «propre», c'est-à-dire exempt de contaminants chimiques. On recueille généralement le sédiment dans un lieu situé à proximité de celui où on a prélevé le sédiment dont on évalue la toxicité, mais qui n'est pas touché par la ou les sources contaminantes.

Solution mère - Solution aqueuse concentrée de la substance à expérimenter. Des volumes mesurés de la solution mère sont

ajoutés à l'eau de dilution afin de préparer les solutions d'essai aux concentrations nécessaires.

Substance - Type particulier de matériel possédant des propriétés plus ou moins homogènes.

Témoin - Dans le présent rapport, s'emploie de la même façon que le terme «contrôle» (*cf.* ci-dessus).

Termes de toxicologie

Aigu - Qui se produit dans un bref intervalle par rapport à la durée de vie de l'organisme, il s'agirait d'un intervalle de quelques jours dans le cas des échinides qui vivent généralement plusieurs années; par exemple, les oursins verts vivent de quatre à huit ans. Les effets d'une toxicité aiguë devraient apparaître et être observables au bout d'un court intervalle.

Chronique - Qui se produit pendant un intervalle d'exposition relativement long, soit une portion significative, correspondant généralement à 10 % ou plus, de la durée de vie de l'organisme.

CI_p - Concentration inhibitrice pour un pourcentage d'effet donné. Il s'agit d'une estimation ponctuelle de la concentration à laquelle la substance étudiée provoquerait une détérioration donnée d'une fonction biologique mesurable, comme le taux de croissance ou le nombre de jeunes par portée, par rapport au contrôle. Par exemple, une CI_{25} pourrait être la concentration que l'on estime causer une diminution de 25 % du taux de croissance par rapport au contrôle. Cette expression devrait être utilisée pour tout essai toxicologique visant à mesurer un changement quantitatif comme une modification du taux de croissance, de la fréquence respiratoire ou du taux de reproduction. Dans le présent essai sur les échinides, on évalue les effets non mesurés sur le sperme, les oeufs et la fécondation par le pourcentage d'inhibition de la fécondation. L'expression concentration efficace moyenne (CE_{50}) ne s'applique pas à des essais de cette nature parce qu'elle est limitée à des résultats de type «tout ou rien», comme le fait d'estimer que 50 % des organismes exposés à cette concentration subiraient un effet particulier, tandis que les autres 50 % ne manifesteraient aucun effet. De plus, on ne peut établir la CE_{50} dans un essai sur la fécondation chez les échinides, car, bien que seul le sperme soit en contact avec la substance à expérimenter pendant une grande partie de l'exposition, et qu'il est donc possible qu'il subisse les effets les plus importants, on ne fait aucune mesure quantique directe du nombre de spermatozoïdes ou de la proportion de sperme altérés. En outre, on ne procède à aucune observation particulière des oeufs à la fin de leur

exposition. Les mesures de la diminution de la fécondation ne représentent que les conséquences des divers effets subis par le sperme, par les oeufs ou par les deux types de gamètes. En conséquence, il est préférable de traiter les mesures comme des observations quantitatives et de les exprimer par la CI_p de la fécondation affaiblie.

CMEO - Concentration minimale avec effet observé. Il s'agit de la concentration la plus faible d'une substance à expérimenter qui, lorsque des organismes sont exposés, provoque chez eux des effets nocifs qui sont détectés par l'observateur et sont statistiquement significatifs. Ainsi, la CMEO pourrait être la concentration la plus faible à laquelle le taux de fécondation du groupe étudié diffère de façon significative de celui du groupe témoin. En règle générale, on se sert de la CMEO uniquement pour exprimer les effets sublétaux.

CSE - Concentration seuil d'effet. Il s'agit de la moyenne géométrique de la CSEO et de la CMEO. «Seuil de toxicité chronique» ou «seuil de toxicité subchronique» sont des termes qui peuvent également être utilisés dans ce sens selon la durée de l'exposition pendant l'essai.

CSEO - Concentration sans effet observé. Il s'agit de la concentration la plus élevée d'une substance qui, lorsque des organismes y sont exposés, ne provoque aucun effet nocif observable et statistiquement significatif chez les organismes exposés. Ainsi, la CSEO peut être la concentration la plus élevée de la substance étudiée à laquelle une variable mesurée, comme le taux de fécondation, ne diffère pas de façon significative par rapport au contrôle.

Essai de toxicité - Détermination de l'effet d'une substance sur un groupe d'organismes, de tissus, de cellules ou sur d'autre matériel vivant, dans des conditions définies. Un essai de toxicité aquatique permet généralement de mesurer *a*) le nombre d'organismes qui sont altérés (mesure quantique) ou *b*) intensité des effets observés (effet gradué ou effet quantitatif), après l'exposition des organismes à des concentrations déterminées de produits chimiques, d'effluents, de milieux récepteurs, de lixiviats, d'élutriats ou d'eau de porosité dérivée des sédiments ou de substances solides similaires. L'essai sur la fécondation chez les échinides doit être considéré comme un essai de toxicité à résultat mesurable, car il ne sert pas à établir la proportion de sperme ou d'oeufs qui sont directement touchés, mais seulement l'effet résultant de leur altération.

Essai statique - Essai de toxicité pendant lequel les solutions d'essai ne sont pas renouvelées.

Évaluation d'identification de la toxicité - Prétraitement systématique d'un échantillon (p. ex., ajustement du pH, filtration, aération) suivi d'essais de toxicité. Ces essais permettent de déterminer quel élément d'un mélange complexe est le principal responsable de la toxicité. L'essai de toxicité peut être létal ou sublétal.

Létal - Qui entraîne la mort par action directe. On entend généralement par «mort» la cessation de tous les signes visibles de mouvement ou d'activité.

Résultat - Variables (p. ex., la durée, la réaction des organismes soumis à l'essai) indiquant la fin d'un essai, mesure ou valeur obtenue à la fin de l'essai et caractérisant l'effet de la substance à expérimenter (CSEO, CI_p, etc.).

Sublétal - Nocif pour un organisme vivant, mais en deçà du niveau qui entraîne directement la mort pendant la durée de l'essai.

Toxicité - Capacité propre d'une substance à provoquer des effets nocifs chez des organismes vivants. Les effets pourraient être létaux ou sublétaux.

Toxicité chronique - Effets à long terme associés à des changements dans le métabolisme, la croissance, la reproduction ou l'habilité à la survie.

Valeur chronique - Moyenne géométrique de la CSEO et de la CMEO obtenue lors d'essais comportant une exposition à long terme. Voir aussi le terme recommandé : CSE.

Remerciements

Le présent document a été rédigé en collaboration par MM. J. B. Sprague (Sprague Associates Ltd., Guelph, Ont.) et Donald J. McLeay (McLeay Associates Ltd., West Vancouver, C.-B.). Il est inspiré des méthodes de plusieurs auteurs, laboratoires, organismes et d'autres groupes d'Europe, du Japon, des États-Unis et du Canada et d'une revue des articles de référence pertinents (Sprague et McLeay, 1991). MM. Gary A. Sergy et Richard P. Scroggins (Protection de l'environnement, Conservation et Protection, Environnement Canada) ont agi à titre de responsables scientifiques officiels et ont apporté leur collaboration et leurs conseils techniques pendant toute la durée des travaux.

Les membres du Groupe intergouvernemental sur la toxicité aquatique (GITA) (annexe A) ont participé activement à l'élaboration et à l'examen du document et méritent tous nos remerciements. Nous tenons à souligner en particulier l'apport technique des membres du sous-comité du GITA qui a assumé la responsabilité de la première et de la dernière révisions : Gary A. Chapman [Environmental Protection Agency (EPA) des États-Unis, Newport, OR], Paul A. Dinnel (University of Washington, Seattle, WA), Timothy J. Hall (NCASI, Anacortes, WA), John H. Himmelman (Université Laval, QC), Émilia Jonczyk (Beak Consultants Ltd., Brampton, Ont.), Cathy A. McPherson (EVS Consultants, North Vancouver, C.-B.), et les membres du GITA, Kenneth G. Doe, Richard P. Scroggins, Gary A. Sergy, Graham C. van Aggelen, Peter G. Wells et Stewart G. Yee. Nous tenons également à remercier les laboratoires d'Environnement Canada (Atlantique : K.G. Doe; Pacifique et Yukon : S.G. Yee), Beak Consultants Ltd. (Jennifer Miller, E. Jonczyk) et EVS Consultants (C.A. McPherson) qui nous ont apporté une collaboration précieuse pour les essais de méthodologie en laboratoire.

Les personnes suivantes, qui ont passé en revue des versions préliminaires ou la version définitive, ont offert des renseignements et formulé de nombreux commentaires qui nous ont été fort utiles : Brian S. Anderson (University of California, Santa Cruz, CA), Glenn F. Atkinson (Division des statistiques appliquées, Environnement Canada, Ottawa, Ont.), Robert S. Carr (Fish and Wildlife Service des États-Unis, Corpus Christi, TX), Guy L. Gilron (Sentar, Surrey, C.-B.), Larry R. Goodman (EPA, Gulf Breeze, FL), Christopher W. Hickey (Water Quality Center, Hamilton, Nouvelle-Zélande), Harold H. Lee (University of Toledo, Toledo, OH), Richard Lloyd (Chelmsford, Essex, Grande-Bretagne), Marian L. Nipper (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, São Paulo, Brésil), James M. Osborne (Conservation et Protection, Ottawa, Ont.),

Jerry F. Payne (Pêches et Océans Canada, Saint-John's, T.-N.) et Linda Porebski (Conservation et Protection, Ottawa, Ont.).

Les illustrations de la page couverture ont été fournies par M. Stewart Yee, Laboratoire de toxicité aquatique, région du Pacifique et du Yukon, Environnement Canada.

Section 1

Introduction

1.1 Contexte

Au Canada et ailleurs, on se sert d'essais de toxicité aquatique pour mesurer, prévoir et contrôler le rejet de substances qui pourraient être nocives pour les organismes aquatiques. On ne peut s'attendre à ce qu'un seul organisme ou une seule méthode d'essai réponde aux besoins d'une démarche globale en matière de conservation et de protection de l'environnement. C'est pourquoi le Groupe intergouvernemental sur la toxicité aquatique (GITA) (*cf.* annexe A) a proposé une série d'essais de toxicité aquatique portant chacun sur une seule espèce qui seraient généralement acceptables et qui permettraient de mesurer différents types d'effets toxiques chez des organismes représentatifs de différents niveaux trophiques et groupes taxinomiques (Sergy, 1987). Un essai de toxicité portant sur le taux de fécondation et utilisant des gamètes d'oursins verts et d'oursins plats était l'un des essais de toxicité aquatique qu'on a choisi de normaliser de sorte qu'il permette de respecter les exigences d'Environnement Canada en matière d'essais.

Le présent rapport décrit des méthodes universelles qui s'appliquent à tout essai sur la fécondation utilisant des gamètes d'échinides. Il présente également des ensembles particuliers de conditions et de méthodes, prescrits ou recommandés lorsqu'on applique cet essai à l'évaluation de différents types de substances (à savoir des échantillons de produits chimiques, d'effluents, de lixiviats, d'élutriats, de milieux récepteurs et de sédiments ou d'autres substances solides) (*cf.* figure 1). Les méthodes et conditions applicables à la conduite de l'essai sont définies et, au besoin, expliquées dans des notes en bas de page.

En décrivant les méthodes figurant dans le présent document, on s'est efforcé d'assurer un équilibre entre les considérations scientifiques, pratiques et financières, en plus de veiller à ce que les résultats soient assez exacts et précis pour la majorité de leurs cas d'application. Les auteurs ont supposé que le lecteur connaît déjà, dans une certaine mesure, les essais de toxicité aquatique. Le lecteur trouvera des indications pour un certain nombre d'applications et d'options d'essais. Cependant, pour une utilisation réglementaire de l'essai, le choix entre les options proposées et les applications d'essais est laissé à la discrétion des organismes chargés d'établir la réglementation.

1.2 Caractéristiques générales et utilisation des échinides dans des essais

Les oursins verts et les oursins plats appartiennent à l'embranchement des Échinodermes et au sous-embranchement (autrefois considéré comme une classe) des Échinides et c'est pourquoi on peut les désigner collectivement par le terme «échinides». Parmi les autres membres de cet embranchement, qui ne sont cependant pas utilisés pour cet essai, on compte les étoiles de mer, les ophiures, les têtes de gorgone, les holothuries, les crinoïdes ou lis de mer et les comatules. On trouve partout dans le monde des représentants de cet

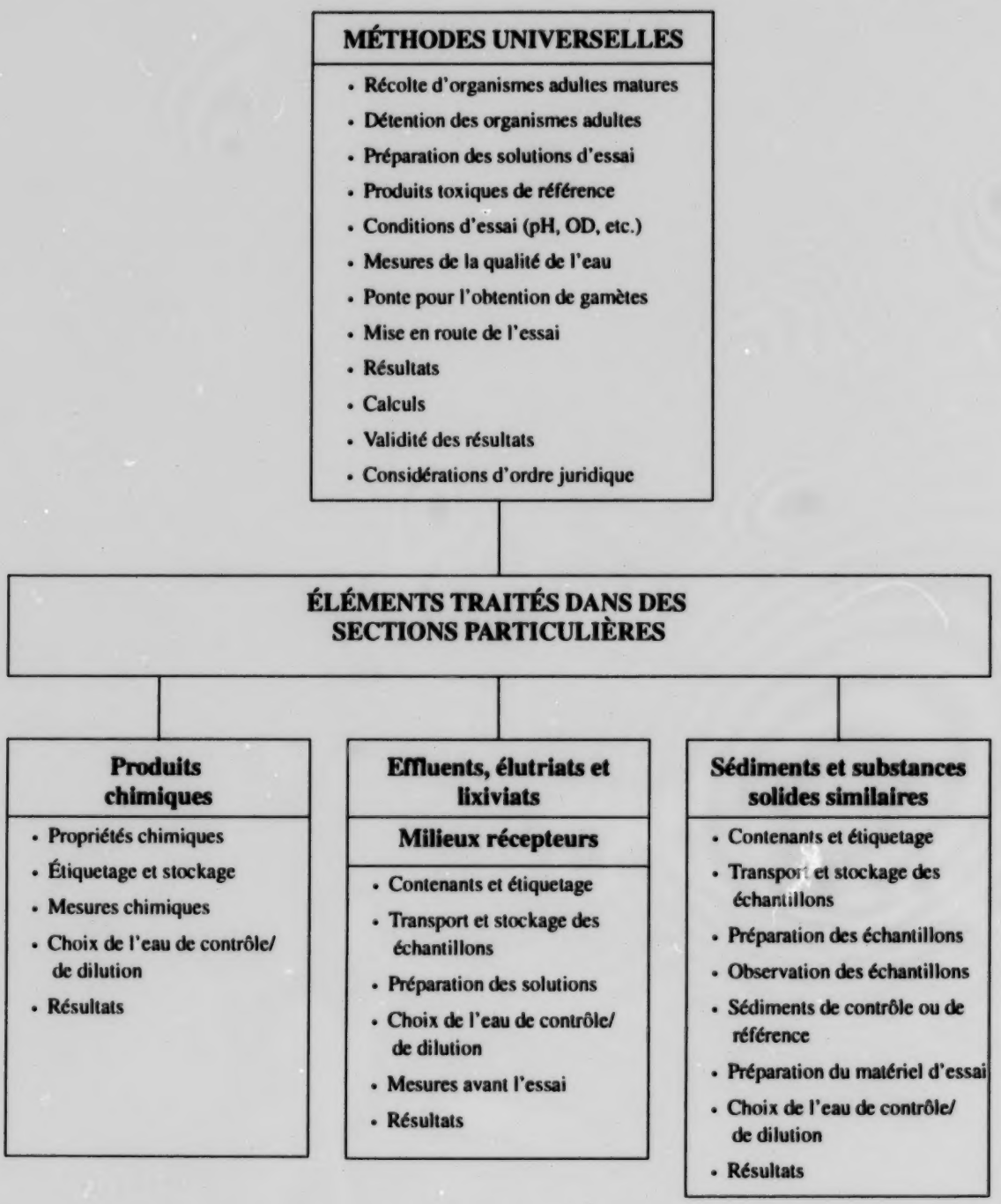


Figure 1 **Schéma de la démarche adoptée pour définir les conditions et méthodes d'essai adaptées à différents types de substances**

embranchement qui compte environ 6 000 espèces vivantes. Sept espèces d'oursins verts et trois espèces d'oursins plats vivent sur le littoral canadien.

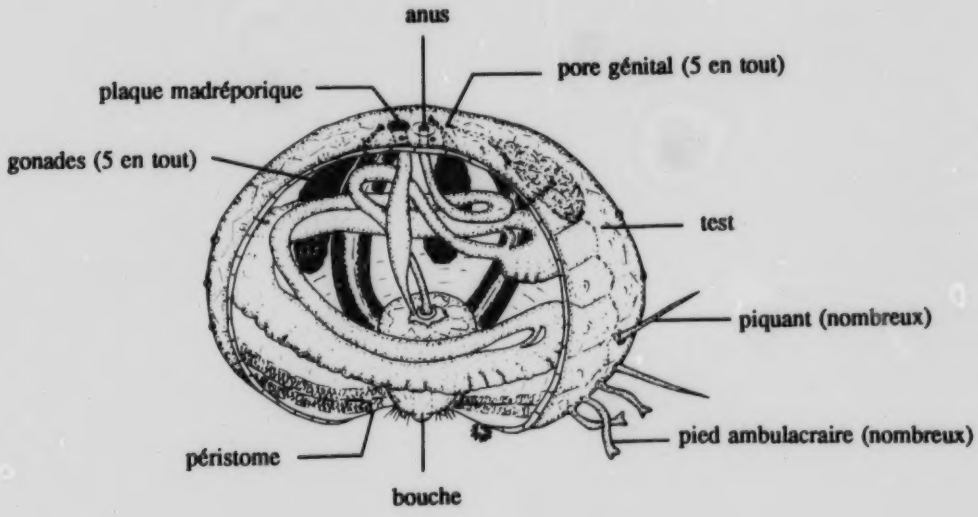
On considère les échinides et les autres représentants du même embranchement comme des invertébrés évolués et complexes sur le plan structural. Ils possèdent de nombreuses caractéristiques élaborées et sont similaires aux vertébrés à de nombreux égards, notamment pour ce qui est du modèle élémentaire de développement embryonnaire et de certains processus biochimiques. Ils présentent une symétrie radiaire apparente, leur corps étant composé de cinq parties disposées autour d'un axe central, qui cache une symétrie bilatérale. Ils possèdent un squelette interne véritable recouvert d'un mince épiderme. L'endosquelette est constitué de petites plaques calcaires unies les unes aux autres qui, chez l'oursin vert et chez l'oursin plat, sont fusionnées et forment une enveloppe solide appelée «test». Les échinides et les autres représentants sont pourvus d'un coelome, ou cavité interne, important dont la plus grande partie entoure les organes internes (*cf.* figure 2). Une autre partie du coelome est un système aquifère (ou système «hydraulique») constitué de canaux en forme de tubes qui parcourent tout le corps; ce système sert au mouvement de petits pieds ambulacraires associés à la locomotion et à d'autres fonctions.

Les oursins verts sont de forme sphérique et recouverts d'épines tandis que les oursins plats sont aplatis suivant l'axe dorso-ventral et ont généralement la forme d'un disque (*cf.* figure 2). Ils reposent sur leur face ventrale. La bouche des oursins verts est entourée d'une membrane appartenant au péristome. Au cours de cet essai, on doit injecter une solution chimique à travers cette membrane dans le coelome. Chez l'oursin plat, on doit faire l'injection dans la bouche. L'anus des oursins verts est situé sur la face aborale (dirigée vers le haut), mais chez l'oursin plat, il est situé sur la même face que la bouche.

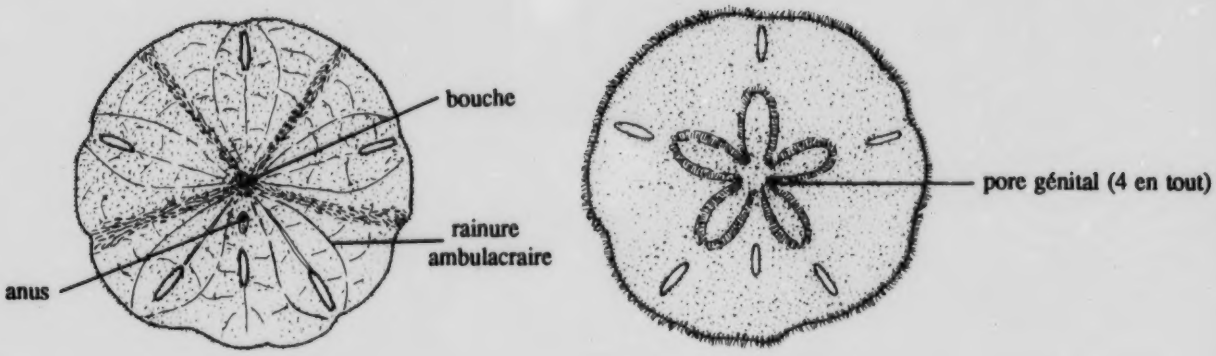
Les sexes sont séparés mais aucune caractéristique externe ne les distingue. Ils possèdent de grosses gonades internes (*cf.* figure 2) qui s'ouvrent, sur la face aborale, par cinq pores génitaux chez l'oursin vert et quatre chez l'oursin plat. Un des pores des oursins verts est situé sur la plaque madréporique, une large plaque visible du test où aboutit le système aquifère de l'animal. Les gamètes sont rejetés, à travers les pores génitaux, dans la mer où la fécondation a lieu.

Le développement des oursins verts, depuis l'oeuf jusqu'au dernier stade larvaire (larve plutéus), est d'un grand intérêt sur le plan embryologique; en 1980, plus de 5 000 articles avaient déjà été publiés à ce sujet (NRC, 1981). C'est ainsi que depuis de nombreuses décennies, on utilise les larves d'oursins verts dans les essais de toxicité (Lillie, 1921, Drzewina et Bohn,1926; Bougis, 1959). À cet égard, il faut souligner une étude particulièrement élaborée réalisée au début du siècle sur les effets de la toxicité des métaux sur la fécondation chez l'oursin vert (Hoadley, 1923). L'oursin vert et l'oursin plat sont aujourd'hui abondamment utilisés à titre d'organismes types dans les essais de toxicité (Dinnel *et al.*, 1987; 1988), et un large bassin de données toxicologiques s'est constitué (Kobayashi, 1984).

L'essai sur la fécondation chez les échinides est sensible. Ainsi, des effluents municipaux ont produit un effet très important sur la fécondation des oeufs malgré une concentration dix fois moins élevée que celle qui avait causé la mort de 50 % des



a.



b. c.

Figure 2 **Caractéristiques générales des échinides**
a. Vue en coupe d'un oursin type *Arbacia punctulata*, sur laquelle on peut voir les pores génitaux situés sur la face aborale (dorsale). On n'a représenté que deux ou trois piquants et pieds ambulacraires bien qu'ils soient très nombreux.
b. Face orale (généralement dirigée vers le bas) d'un oursin plat type.
c. Face aborale d'un oursin plat sur laquelle on peut voir les pores génitaux [dessins de M.A. White, tirés de Storer *et al.* (1979) et de Barnes (1974)].

têtes-de-boule lors d'un essai de quatre jours (Oshida *et al.*, 1981). Des six essais de sublétalité (en milieu marin et en eau douce) réalisés dans le cadre d'une étude interlaboratoire sur la toxicité des effluents en Californie, l'essai sur la fécondation chez les échinides se classait au deuxième ou au troisième rang pour ce qui est de la sensibilité (Anderson *et al.*, 1991). L'essai, d'une durée de 80 min, était plus sensible aux effluents provenant d'une station municipale de traitement des déchets que les essais de 48 h sur les embryons et les larves d'huîtres et de crabes (Dinnel et Stober, 1987). On a obtenu des résultats variables quant à la toxicité comparée de composés métalliques et de composés organiques selon qu'il s'agissait d'un essai sur la fécondation, d'un essai de luminescence bactérienne ou d'essais de létalité aiguë sur des poissons et des crustacés. Les essais sur les échinides pouvaient être dix, cent ou mille fois plus sensibles et, dans certains cas, dix fois moins sensibles que les autres (Nacci *et al.*, 1986). Les résultats des essais sur la fécondation chez les échinides indiquaient une sensibilité équivalente à celle des essais sur les embryons et sur les larves de crabes, de calmars et de poissons, une sensibilité relative aux métaux, mais beaucoup moindre aux pesticides que les essais de létalité aiguë sur les poissons de mer (Dinnel *et al.*, 1989). Dans le cas des déchets produits par les usines de pâtes et papiers, le *National Council of the Paper Industry for Air and Stream Improvement* (NCASI) (1992) mentionne les résultats des travaux de Johnson *et al.* (1990) qui indiquent que les essais sur les embryons et les larves d'huîtres étaient environ dix fois plus sensibles que les essais sur la fécondation chez les échinides. Par contre, l'essai sur les échinides était au moins aussi sensible qu'un essai sur la reproduction des algues rouges et souvent jusqu'à dix fois plus sensible que les autres essais de sublétalité en milieu marin sur la croissance et le développement des larves de poissons (athérénidés et *Cyprinodon variegatus*) ou des jeunes mysis (crevettes) (Schimmel *et al.*, 1989).

L'essai sur la fécondation est un essai de sublétalité sensible. Les gamètes et le sperme correspondent à un des stades de développement les plus vulnérables de tout le cycle de vie, si ce n'est le plus sensible, aux différents produits toxiques utilisés lors des essais (Kobayashi, 1980; 1984). Cependant, comme sa durée est très courte par rapport à celle des espèces (quelques années), il ne constitue donc pas un essai chronique et ne permet pas d'évaluer les effets d'une exposition à long terme. L'essai sur la fécondation décrit dans le présent rapport ne remplace pas les essais de toxicité chronique portant sur les échinides étant donné qu'il ne permet pas d'estimer les effets d'expositions de longue durée. On prévoit toutefois qu'il est en mesure de produire des résultats qui s'approchent davantage de ceux des essais chroniques que ne le ferait un essai de létalité classique sur une espèce marine ou d'eau douce (p. ex., Environnement Canada, 1990a; 1990b).

La précision de cet essai semble satisfaisante. Selon l'*Environmental Protection Agency* (EPA) des États-Unis (1988), les coefficients de variation pour les CI_{50} des produits toxiques de référence lors d'essais sur une espèce d'échinide (*Arbacia punctulata*) étaient de 30 à 48 % à l'intérieur d'un même laboratoire. En comparant les CI_{50} du cuivre obtenues par six laboratoires lors d'essais sur quatre espèces d'échinides, menés dans le cadre d'un programme d'évaluation de la toxicité d'effluents, on obtenait un coefficient de variation de 74 % contre 29 à 38 % pour des essais sublétaux sur une seule espèce [reproduction de *Ceriodaphnia* et premiers stades des têtes-de-boule et des huîtres (Anderson et

Norberg-King, 1991)]. En comparant les CI_{25} du cuivre au cours de cinq essais portant chacun sur une seule espèce et effectués par différents laboratoires canadiens, on a obtenu des coefficients de variation de 62, 65, 75, 82 et 110 % (trois espèces d'oursin vert ont été soumises à l'essai et exposées pendant une durée totale de 20 min). Les coefficients de variation pour les CI_{50} des mêmes essais étaient plus faibles, soit 23, 48, 57, 80 et 94 % (Miller *et al.*, 1992). Ces coefficients, mesurés par des essais interlaboratoire et dont la moyenne s'établit à 79 % pour les CI_{25} et à 63 % pour les CI_{50}, indiquent une précision comparable à celle des analyses chimiques, dont le coefficient moyen se situait à 60 % à la suite d'une comparaison interlaboratoire des résultats d'analyses chimiques des polluants d'intérêt prioritaire (Rue *et al.*, 1988). Les résultats récents d'essais comparatifs interlaboratoires commandités par l'EPA, qui n'ont pas encore été publiés, semblent corroborer ces résultats. Les coefficients de variation sont de 57 % pour les essais sur la fécondation de 40 min et de 86 % pour les essais de 80 min (NCASI, 1992).

Au Canada, l'essai sur la fécondation chez les échinides a été utilisé dans plusieurs laboratoires gouvernementaux et industriels de toxicité aquatique. Des méthodes d'essai normalisées ont été décrites en Colombie-Britannique (ministère de l'Environnement de la Colombie-Britannique, 1990; van Aggelen, 1988) ainsi que par des sociétés d'experts-conseils (Beak, 1988; EVS, 1989). Sur le plan national, un organisme fédéral-provincial (GITA, 1991) a commandité une étude sur des méthodes d'essai, menée par certains laboratoires régionaux d'Environnement Canada (*cf.* annexe B). D'autres études interlaboratoires ont été réalisées l'année suivante par des laboratoires fédéraux, provinciaux (ministère de l'Environnement de la Colombie-Britannique) et du secteur privé (Miller *et al.*, 1992). Les essais sur les échinides ont été étudiés et recommandés par un scientifique d'Environnement Canada (Wells, 1982; 1984), mais aucun organisme fédéral canadien n'a publié de méthode normalisée.

Aux États-Unis, plusieurs groupes ont proposé des méthodes d'essai de toxicité sublétale sur les échinides. L'EPA a mis au point une méthode qui fait autorité en ce qui a trait aux essais sur les espèces d'échinides indigènes de la côte atlantique (EPA, 1988) et de la côte pacifique (Chapman, 1991; 1992). L'*American Society for Testing and Materials* (ASTM) (1990) travaille également à la mise au point de méthodes d'essai. De plus, le NCASI (1992) a fait une critique des méthodes récentes applicables surtout aux essais sur les effluents de l'industrie des pâtes et papiers. En outre, un certain nombre de sociétés d'experts-conseils et d'autres laboratoires de biologie marine ont publié des méthodes adoptées par leurs organisations (*cf.* annexe C).

De nombreux auteurs et groupes d'auteurs ont publié des articles présentant des méthodes normalisées. Parmi ceux-ci, on note les articles de Kobayashi, de Dinnel et de ses coauteurs ainsi que de Pagano et de ses collaborateurs. Certains de ces articles apparaissent dans les références et de nombreux autres figurent dans la bibliographie (*cf.* annexe D).

Plusieurs raisons motivent l'utilisation d'un essai sur la fécondation chez les échinides comme méthode d'évaluation de la toxicité sublétale dans les milieux marins au Canada. En règle générale, l'essai est rapide, sensible et relativement simple. Il présente, entre autres, les avantages suivants (NRC, 1981;

Dinnel et Stober, 1985; Esposito *et al.*, 1986; Dinnel *et al.*, 1987) :

- la biologie et l'histoire des principales espèces sont bien documentées;
- ces organismes sont présents en grand nombre sur les trois côtes canadiennes;
- la récolte des oursins verts et des oursins plats adultes en eau peu profonde ne présente aucune difficulté;
- la détention des organismes adultes en laboratoire est simple, et les conditions peuvent aisément être modifiées de façon à prolonger la saison de reproduction;
- des gamètes de qualité et de sensibilité uniformes peuvent être obtenus;
- le taux de fécondation est un indicateur sensible et fondamental de la sublétalité;
- l'essai sur la fécondation est rapide et économique, car il est de peu d'envergure, facile à réaliser et ne nécessite que des installations et de l'équipement ordinaires;
- les oeufs d'échinides sont déjà haploïdes au moment de leur libération, contrairement à ceux de la plupart des animaux, et c'est pourquoi il n'y a pas de délais;
- le résultat de l'essai est relativement simple et objectif;
- les échinides sont largement répandus et fréquemment utilisés comme espèces marines types à des fins de réglementation et de recherche. On peut facilement les expédier et les utiliser dans des laboratoires éloignés des océans.

L'essai sur la fécondation chez les échinides, associé aux méthodes d'évaluation de l'identification de la toxicité (EIT) décrites par l'EPA (1991a, 1991b), semblerait convenir, tout comme les essais de toxicité générale en milieu marin, à l'identification de constituants sublétaux d'effluents complexes.

Le présent rapport «générique» a pour objet de fournir des méthodes d'essais canadiennes normalisées pour l'évaluation de la toxicité sublétale de différentes substances sur les gamètes d'échinides. Il préconise certaines options parmi les paramètres possibles dans le cadre d'une méthode normalisée, notamment le choix des espèces, la durée de l'exposition, le type d'essai (sur une seule concentration de la substance étudiée, à résultat unique, ou sur plusieurs concentrations), les volumes d'essai et le type d'eau utilisée pour la dilution et les contrôles. Si l'on devait adopter, au Canada, un essai réglementé sur la fécondation chez les échinides, celui-ci comporterait une méthode rigoureuse, définie à partir des éléments mentionnés dans le présent rapport. Les méthodes d'essai sur les échinides déjà publiées ne présentent pas les mêmes résultats et n'abordent pas de la même façon les questions telles que l'ajustement du pH, l'adaptation des méthodes aux objectifs, la sélection de l'eau de contrôle/de dilution et le traitement des échantillons contenant une quantité appréciable de solides ou de matière flottante. Le rapport concerne l'évaluation de la toxicité sublétale d'échantillons de produits chimiques, d'effluents, de lixiviats, d'élutriats, de milieux récepteurs et de liquides dérivés de sédiments et de substances solides assimilées. Il donne également les arguments qui étayent le choix d'une démarche particulière.

La méthode préconise l'utilisation d'animaux acclimatés à l'eau de mer et d'eau de mer en guise d'eau de dilution et d'eau de contrôle. Selon les objectifs de l'essai, l'eau de mer peut être reconstituée ou naturelle, mais sa salinité devrait être voisine de celle de l'eau de mer naturelle. Pour évaluer la toxicité létale et sublétale de produits chimiques ou d'eaux résiduaires qui sont ou doivent être rejetés dans les milieux d'eau douce, on doit recourir à d'autres essais portant sur les poissons d'eau douce ou sur d'autres organismes sensibles vivant en eau douce (Environnement Canada, 1990a; 1990c; 1992a; 1992b).

Organismes soumis à l'essai

2.1 Espèces

L'essai peut être mené sur n'importe laquelle des espèces énumérées ci-dessous. On peut également avoir recours à d'autres espèces indigènes, si elles répondent aux exigences de l'essai.

Strongylocentrotus droebachiensis (O.F. Müller), l'**oursin vert** est une espèce circumpolaire que l'on trouve sur les côtes atlantique et pacifique du Canada ainsi que dans l'océan Arctique, jusqu'au 80e parallèle.

Strongylocentrotus purpuratus (Stimpson), appelé **oursin violet du Pacifique** dans le présent rapport (et communément appelé oursin violet), désigne une espèce que l'on trouve sur la côte pacifique, du Canada jusqu'en Basse-Californie (Meinkoth, 1981).

Dendraster excentricus (Eshscholtz) est un clypéaster de la côte pacifique du Canada que l'on trouve également plus au sud. Dans le présent rapport, on utilise son nom commun officiel, soit le **clypéaster excentrique** (Meinkoth, 1981).

Arbacia punctulata (Lamarck), **l'oursin violet de l'Atlantique** (Meinkoth, 1981) se retrouve sur la côte atlantique des États-Unis, de Cape Cod jusqu'aux Caraïbes, et dans le golfe du Mexique.

Lytechinus pictus (Verrill) est aussi appelé **oursin blanc**. Sa zone de distribution s'étend de la Californie jusqu'à Panama.

Les quatre premières espèces énumérées ici peuvent être recueillies sur une ou plusieurs côtes canadiennes, tandis que l'oursin violet de l'Atlantique et l'oursin blanc sont vendus par des fournisseurs d'animaux de laboratoires qui se chargeront de les expédier. Si les espèces locales ne sont pas en période de ponte, on peut se procurer, dans le commerce ou par l'entremise d'ententes interlaboratoires, d'autres espèces qui pourraient satisfaire aux exigences des essais.

Toutes les espèces énumérées ci-dessus figurent sur la liste des échinides couramment utilisés en laboratoire (NRC, 1981), et la plupart ont, à maintes reprises, servi à des essais de toxicité (*cf.* annexe C). En général, les résultats des essais de toxicité sur la fécondation chez les échinides sont similaires quelle que soit l'espèce étudiée (Kobayashi, 1984; Nacci *et al.*, 1986). Ils peuvent cependant présenter de légers écarts sur le plan de la sensibilité; en effet, le clypéaster excentrique semble environ 1,4 fois plus sensible à du dodécyl sulfate de sodium que l'oursin violet du Pacifique et 1,7 fois plus sensible à des effluents de fabriques de pâtes au sulfite blanchies que l'oursin vert (NCASI, 1992).

L'oursin plat, *Echinarachnius parma* (Lamark), n'a pas été souvent utilisé dans les essais de toxicité et n'a pas très bien réussi lors d'une récente évaluation interlaboratoire de cet essai de fertilisation chez les échinides, lequel comportait plusieurs espèces (Miller *et al.*, 1992). Par conséquent, on ne recommande pas actuellement l'utilisation de l'oursin plat lors de cet essai jusqu'à ce que la recherche démontre qu'il est adéquat. La distribution

circumpolaire de l'oursin plat, y compris sa présence courante le long de la côte atlantique, du Canada jusqu'au Maryland, sontient une recherche plus poussée de cette espèce. Osborne et Leeder (1989) ont eu recours à des oursins plats adultes à Terre-Neuve pour des essais de toxicité s'étendant sur plusieurs mois. En outre, Karnofsky et Simmel (1963) et Meador *et al.* (1990) ont respectivement étudié les effets des produits chimiques inhibant la croissance de cet ouisin et les effets des contaminants présents dans les sédiments sur les premiers stades de son développement.

Le transfert d'animaux d'un milieu marin à un autre soulève d'importants problèmes liés à l'introduction d'espèces non indigènes, de maladies et de parasites. Tout projet visant à se procurer, à expédier ou à transférer des échinides devrait d'abord être approuvé par l'administration provinciale ou régionale. Les gouvernements provinciaux peuvent exiger un permis pour l'importation de certaines espèces, qu'elles soient indigènes ou non. De plus, un comité fédéral-provincial chargé de l'introduction et de l'implantation d'animaux peut exercer un contrôle sur le transfert d'organismes aquatiques. Le bureau régional de Conservation et Protection (*cf.* annexe B) peut fournir des renseignements sur les comités ou les organismes provinciaux compétents ainsi que sur les sources d'approvisionnement en échinides. On doit adresser les demandes de permis d'importation d'animaux au comité mentionné ci-dessus, à l'organisme provincial responsable ou au directeur général régional du ministère des Pêches et des Océans, selon les directives en vigueur dans la région.

2.2 Stades de développement, taille et origine des organismes

On devrait se procurer des échinides matures et gravides afin d'obtenir des gamètes. La taille des adultes est de 3 cm de diamètre ou plus, selon l'espèce (*cf.* tableau 1); généralement, la taille des échinides utilisés en laboratoire se situe entre 5 et 6 cm.

Tous les gamètes servant à un essai devraient provenir d'adultes appartenant à une même population originaire d'une même source. On peut recueillir les espèces indigènes en milieu marin, dans des eaux côtières propres, en eau peu profonde à marée basse ou plus au large en plongeant. Par ailleurs, toutes les espèces peuvent être achetées auprès de fournisseurs d'animaux de laboratoire.

Si l'on se reporte au tableau 1, qui indique les saisons de ponte, on constate qu'il est possible de réaliser des essais presque toute l'année, dans une région donnée, si les oursins et les clypéasters sont recueillis au moment opportun. On pourrait prolonger la période d'essai en abaissant ou en élevant la température du milieu de conservation des adultes afin de déclencher ou de retarder la ponte, selon le cas. Ainsi, en modifiant les conditions de garde, les laboratoires canadiens peuvent obtenir des gamètes pendant presque toute l'année, si ce n'est toute l'année (Wells, 1982; 1984). On pourrait aussi acheter des espèces provenant de l'extérieur dont la saison de ponte coïncide avec la période à laquelle on désire faire l'essai. Il ne faudrait cependant pas oublier que la saison et la durée de la ponte ainsi que la température optimale permettant de déclencher la ponte ne sont pas les mêmes chez les animaux d'origine et de milieux climatiques différents. Les oursins que l'on a fait pondre au début de la saison peuvent parfois produire de nouveaux gamètes de quatre à six semaines plus tard si on les

Tableau 1 Caractéristiques générales et utilisation des échinides dans les essais

Espèces	Saison de ponte*	Diamètre maximum de l'adulte (cm) **	Température de garde (°C) ***
Oursin vert	- Avril (en général); de mars à mai dans certains endroits au Canada; jusqu'en juin dans l'estuaire du Saint-Laurent (janvier, juin +)	8,3	**9**, ≤12
Oursin violet du-Pacifique	- De janvier à mai (en général); de janvier à mars (période optimale); pour les organismes féraux (décembre à juin)	10	**12**, ≤17
Clypéaster excentrique	- Mai à octobre (février à décembre)	9	**12**, ≤17
Oursin violet de l'Atlantique	- Juin à août	5,1	**15**, ≤22
Oursin blanc	- Mars à novembre	♂ 2,8 ♀ 3,2	**15**, ≥8 ≤24

* Les mois entre parenthèses indiquent la saison à laquelle il est possible de prolonger en laboratoire la période de ponte en élevant ou en abaissant la température. Ces renseignements sont tirés des documents de référence utilisés à l'annexe C : Meinkoth (1981), NRC (1981), Strathmann (1987), Starr (1990) et de l'information obtenue auprès des chercheurs cités au chapitre des remerciements.

** Ces chiffres indiquent la taille maximale de l'animal. Pour la plupart des espèces, le diamètre des spécimens gardés en laboratoire est de 5 à 6 cm.

*** Les températures en caractère gras sont les températures types recommandées pour obtenir des gamètes de façon naturelle; ces données sont tirées des documents cités à l'annexe C ou obtenues du NRC (1981). On peut avoir recours à d'autres températures pour accélérer ou ralentir la maturation ou simplement maintenir la température de l'eau de mer naturelle d'arrivée. On indique parfois les valeurs minimales et maximales.

alimente de façon appropriée (Dinnel et Stober, 1985). Il faudrait toutefois les transférer dans un réservoir distinct après la première ponte.

Il est important de s'assurer que les gamètes sont matures avant de s'en servir pour un essai de toxicité. Le sperme et les oeufs recueillis en dehors de la période de maturation peuvent produire de faibles taux de fécondation et des résultats peu concluants. La détermination du degré de maturité demande une certaine expérience de la part du chercheur; on peut l'évaluer en faisant pondre un échantillon d'échinides (*cf.* 4.2.1) et en examinant les gamètes ainsi obtenus. Les spermatozoïdes matures sont minuscules et deviennent rapidement très actifs dans l'eau de mer tandis que les oeufs matures deviennent sphériques. On

reconnaît les oeufs immatures à la présence d'une tache claire dans leur cytoplasme. Il est également possible de sacrifier certains adultes pour examiner leurs gonades et recueillir directement les gamètes au lieu de les faire pondre. Chez l'oursin, la coloration des ovaires matures varie du jaune au rouge selon les espèces, et les testicules sont blancs.

2.3 *Conservation d'adultes en laboratoire*

2.3.1 Généralités

On garde les groupes d'échinides mâles et femelles dans des réservoirs afin d'obtenir les gamètes nécessaires aux essais. Il n'existe aucune restriction quant à la durée de conservation nécessaire ou recommandée des organismes avant qu'il n'y ait production de gamètes. On a déjà conservé et alimenté des oursins verts, des oursins violets du Pacifique et des clypéasters excentriques pendant plusieurs mois. Il est toutefois souhaitable de garder les organismes trois ou quatre jours à la température de l'essai et dans l'eau qui sera utilisée pour les contrôles et les dilutions avant de procéder à l'essai. L'obtention de gamètes viables et répondant aux exigences de l'essai est le critère qui permet d'établir que les conditions de garde sont satisfaisantes.

Il faudrait manipuler les échinides avec soin et éviter de leur imposer des chocs ou de bouleverser leurs conditions de garde. Il faut porter une attention particulière aux variations importantes de température ou de pression hydrostatique qui peuvent déclencher la ponte à un moment qui ne convient pas au chercheur (Dinnel et Stober, 1985). Dans certains laboratoires utilisant de l'eau de mer naturelle n'ayant pas subi de microfiltration, on a constaté qu'une ponte importante peut se produire chez les oursins au moment des efflorescences de plancton, phénomène qui a pu être observé dans les eaux canadiennes (Starr, 1990; Starr *et al.*, 1990). De plus, la ponte d'un individu étant susceptible de provoquer celle d'autres organismes, on devrait isoler immédiatement cet adulte pour éviter une ponte massive.

Les recommandations concernant les conditions de garde des échinides, résumées dans les tableaux 1 et 2, ont été formulées de façon à permettre une certaine souplesse tout en normalisant les paramètres qui, s'ils ne sont pas contrôlés, pourraient nuire à la santé des animaux ou à la viabilité de leurs gamètes. Les conditions recommandées sont généralement tirées des documents présentés à l'annexe C. Ces documents, de même que les articles cités dans les références du document et dans la bibliographie et les références, présentées à l'annexe D, en particulier ceux de l'ASTM (1990), de l'EPA (1988), du NCASI (1991) ainsi que les communications de Dinnel et de ses collègues, contiennent des arguments à l'appui de ces recommandations et d'autres détails pertinents.

2.3.2 Réservoirs de garde des échinides

On peut conserver les organismes adultes dans des aquariums, des bassins ou des réservoirs faits de matériaux non toxiques comme le verre, l'acier inoxydable, la porcelaine, le polyester armé de fibre de verre, les plastiques de perfluorocarbone (Teflon^{MC}), l'acrylique, le polyéthylène ou le polypropylène. Les réservoirs d'une capacité de 50 à 150 L munis d'une colonne d'alimentation sont les plus courants. Ils devraient être placés à l'abri de perturbations physiques importantes et, de préférence, à l'écart de l'endroit où auront lieu les essais. De plus, de façon à prévenir les pontes massives indésirables, on devrait conserver les adultes en groupes de 20 individus ou moins.

La profondeur de l'eau dans les réservoirs contenant les oursins devrait être d'au moins 20 cm. Dans le cas des clypéasters, on utilise souvent des plateaux de 1 × 2 m contenant 10 cm d'eau et de 2 à 3 cm de sédiments ou de sable riches en détritus, notamment des cellules algales décantées.

2.3.3 Éclairage

Dans le cas des oursins, l'éclairage et la photopériode semblent peu importants, et l'éclairage normal de faible intensité des laboratoires est généralement suffisant. Dans le cas des clypéasters, un appareil fluorescent suspendu, fournissant un éclairage équivalent à celui d'un bureau bien illuminé, stimule la croissance des algues qui se trouvent dans les sédiments. De cette façon, les clypéasters peuvent devenir autosuffisants sur le plan alimentaire.

2.3.4 Eau

On devrait continuellement ou périodiquement renouveler l'eau des réservoirs dans lesquels les adultes sont conservés afin de prévenir l'accumulation de déchets métaboliques. On peut utiliser de l'eau de mer naturelle non contaminée ou de l'eau de mer reconstituée. Toutefois, il faudrait s'assurer au préalable que cette eau constitue un milieu propice et fiable à la survie et à la santé des échinides. La source en eau devrait être surveillée et contrôlée aussi souvent que possible pour en établir la qualité. La qualité de l'eau devrait être surveillée et évaluée grâce à une mesure, de préférence quotidienne, de la température, de la salinité, de l'oxygène dissous, du pH et du débit de chaque réservoir. S'il y a lieu, on devrait aussi mesurer la teneur en gaz dissous totaux, en azote ammoniacal, en nitrites, en métaux et en pesticides ainsi que la quantité de solides en suspension et de carbone organique.

De façon générale, dans les systèmes où l'eau de mer est constamment renouvelée, le chercheur devrait tenter de maintenir un débit d'au moins 5 à 10 L/d par organisme; de plus, le débit devrait garantir le renouvellement de la totalité de l'eau contenue dans le réservoir en un laps de temps allant de 6 à 12 h. On peut maintenir un taux de renouvellement équivalent dans les réservoirs d'essai statique en remplaçant chaque jour la plus grande partie de l'eau. Toutefois, si l'on en juge d'après les méthodes utilisées, il ne semble pas exister de consensus quant à la quantité d'eau à utiliser et la fréquence de renouvellement souhaitable (*cf.* annexe C). Le plus souvent, le débit n'est pas précisé et, dans les rares cas où on trouve des indications à ce sujet, ce débit varie de niveaux très élevés correspondant à des centaines de litres par jour par animal, la totalité de l'eau du réservoir étant renouvelée en quelques minutes, à des débits beaucoup plus faibles correspondant à un renouvellement de l'eau en 5 h environ. Le NCASI (1991, 1992) utilise des débits d'eau de mer similaires à ceux recommandés dans le présent document, soit de 7 à 14 L/d par clypéaster et le remplacement de toute l'eau du réservoir en 1,3 à 2,7 h.

La salinité moyenne de l'eau devrait se situer entre 28 et 34 g/kg, de préférence, entre 30 et 32 g/kg. Cependant, en présence

Tableau 2 Liste de contrôle des conditions et des méthodes recommandées pour la garde des échinides

Origine des adultes	Prélevés dans des eaux propres ou achetés chez des fournisseurs d'animaux de laboratoire.
Eau	Eau de mer non contaminée ou eau de mer reconstituée; eau d'écoulement ou semi-statique (remplacée une fois toutes les 24 h); salinité moyenne de 28 à 34 g/kg, toujours dans une plage de 25 à 35 g/kg; en général, le débit devrait fournir de 5 à 10 L/d par animal et permettre au réservoir de se remplir en un laps de temps allant de 6 à 12 h.
Température	De 9 à 15 °C selon les espèces; températures légèrement inférieures ou supérieures pour retarder ou provoquer la ponte (*cf.* tableau 1); taux maximal d'élévation ou de baisse de température de 3 °C/d.
Oxygène et aération	Oxygène dissous dont la saturation en air varie de 80 à 100 %; ces valeurs sont maintenues par aération avec de l'air filtré exempt d'huile, au besoin.
pH	Entre 7,5 et 8,5, et normalement entre 8,0 et 8,2.
Qualité de l'eau	Contrôler la température, la salinité, la teneur en oxygène dissous, le pH et le débit de tous les réservoirs, de préférence quotidiennement.
Éclairage	Éclairage normal de faible intensité; ce facteur n'est pas jugé comme critique.
Alimentation	Pour les oursins : varech, autres macroalgues ou laitue romaine; pour les clypéasters : sédiments contenant des détritus et des algues; prévoir un éclairage suffisant pour stimuler la croissance des algues et ajouter des algues de culture au besoin.
Nettoyage	Retirer les algues décomposées, les matières fécales et les débris chaque jour ou au besoin, à moins que ces éléments ne servent de nourriture.
Morbidité et mortalité	Contrôler la mortalité quotidiennement; elle devrait être inférieure ou égale à 2 %/d en moyenne pendant les sept jours précédant la collecte des gamètes; retirer les animaux malades ou agonisants; on devrait se départir des groupes d'animaux malades.

d'échinides, elle ne devrait jamais être inférieure à 25 g/kg ou supérieure à 35 g/kg[1].

L'eau qui pénètre dans les récipients ne devrait pas être sursaturée de gaz, ce qui peut se produire si l'eau est chauffée. Si ce phénomène risque de se produire, il vaudrait mieux vérifier régulièrement la pression totale des gaz (Bouck, 1982). Si la teneur en gaz dissous dépasse 100 %, on doit recourir à des mesures correctives (p. ex., utilisation de colonnes d'aération ou aération vigoureuse dans un réservoir ouvert).

Si on utilise de l'eau de mer reconstituée pour le contrôle et la dilution (*cf.* subdivision 4.1.1 et sous-section 5.3), il faudrait laisser les adultes s'y acclimater pendant au moins trois jours avant de les faire pondre. De plus, si l'on doit conserver les échinides dans de l'eau de mer reconstituée ou si les réserves d'eau de mer sont limitées, il peut être nécessaire d'avoir recours à la filtration et à la recirculation de l'eau, ou encore de renouveler l'eau régulièrement dans les systèmes statiques. Dans ce genre de situation, il faudrait mesurer fréquemment la teneur de l'eau en ammoniac et en nitrites afin de s'assurer qu'elle n'atteint pas des niveaux nocifs. Aux fins de la protection des organismes aquatiques, on recommande une concentration d'ammoniac désionisé d'au plus 0,02 mg/L et une concentration maximale de nitrites d'au plus 0,06 mg/L (CCMRE, 1987)[2].

On peut préparer de l'eau de mer reconstituée en ajoutant, en quantité suffisante pour obtenir la salinité souhaitée, de la saumure, du sel de mer ou une solution saline en vente dans le commerce (p. ex., Instant Ocean[MC]) à de l'eau douce de qualité satisfaisante. Si on utilise du sel de mer, on devrait vérifier, à l'aide d'essais, l'homogénéité et la qualité des solutions salines préparées avec le même type de sel, car des chercheurs croient que certains lots de sel de mer peuvent avoir des effets toxiques ou emprisonner les substances d'essai. Au besoin, on pourrait préparer des solutions d'eau de mer reconstituée à partir des différents sels contenus dans l'eau, grâce à des méthodes plus ou moins élaborées, selon le cas. Pour ce faire, on devrait consulter des ouvrages spécialisés (Bidwell et Spotte, 1985).

On peut ajouter du sel de mer à l'eau de mer, aux échantillons ou à d'autres liquides pour amener leur salinité au degré souhaité pour l'essai. On recommande généralement de

---

1 La salinité moyenne des océans est de 34,7 g/kg; elle se situe entre 32 et 37 g/kg, sauf dans l'Arctique et sur les littoraux, où elle peut être inférieure à 30 g/kg, et dans les régions chaudes caractérisées par un taux d'évaporation élevé, où elle peut être supérieure à 40 g/kg (Thurman, 1975; McCormick et Thiruvathukal, 1976). Les échinides sont reconnus pour leur osmolalité et pour leur faible tolérance aux variations de salinité. Himmelman *et al.* (1984) ont montré que la capacité de l'oursin vert à se retourner lorsqu'on le place sur le dos était diminuée quand la salinité normale de 30 g/kg était ramenée aux environs de 24 à 25 g/kg, et que cette capacité était un indicateur important de l'état physiologique et de la santé de l'animal. Parmi les méthodes de garde des échinides, celles qui traitent de la salinité recommandent des valeurs inférieures à la salinité type en milieu océanique; on la situe le plus souvent entre 27 et 30 g/kg, avec des valeurs extrêmes de 25 à 35 g/kg (*cf.* annexe C). Les recommandations contenues dans le présent rapport, en particulier celles concernant les valeurs minimales, ont été établies à partir de la salinité normale des eaux du littoral et des eaux utilisées dans des expériences réussies de garde d'échinides (*cf.* 4.3.2).

2 Les valeurs cibles recommandées ont été formulées pour les organismes d'eau douce mais elles devraient également permettre de protéger les organismes marins. Aucun critère n'a été établi concernant la teneur en ammoniac de l'eau de mer, mais il existe beaucoup de documentation sur les valeurs recommandées en eau douce. Dans des conditions normales, en milieu marin, il est peu probable que la teneur en nitrites dépasse les valeurs recommandées.

préparer une saumure (eau très salée) et d'en ajouter au besoin aux différentes solutions d'essai. On peut obtenir cette saumure en congelant de l'eau de mer à une température de -10 à -20 °C et en recueillant l'eau très salée qui se trouve sous la glace, une fois qu'elle a atteint la salinité souhaitée, soit au plus 100 g/kg. Une bonbonne en polyéthylène munie d'un drain de fond convient parfaitement (Chapman, 1992). Une autre méthode consiste à congeler complètement l'eau de mer, pour ensuite la dégeler en partie et recueillir la saumure que constitue la première eau de fonte. On peut également préparer de la saumure par évaporation en chauffant lentement l'eau de mer à environ 40 °C jusqu'à ce que sa salinité se situe entre 60 et 90 g/kg. Si l'on adopte cette dernière méthode, on doit éviter de dépasser la température recommandée ou de préparer des solutions plus salines, car, au moment de diluer la saumure pour obtenir de l'eau de mer de salinité normale, celle-ci ne constitue pas un milieu propice aux organismes aquatiques (ASTM, 1990). Avant sa congélation ou son évaporation, on devrait faire passer l'eau de mer à travers un filtre dont la dimension des pores est d'au plus 10 µm. On a pu conserver sans problème de la saumure pendant un an (NCASI, 1992). Si on utilise de la saumure dont la salinité est de 90 g/kg pour amener la salinité des solutions d'essai à 30 g/kg, la proportion d'effluents (ou d'autres échantillons d'eau douce) contenus dans la solution d'essai ne pourra être supérieure à 67 %[3]. Pour amener à 30 g/kg la salinité d'une solution d'essai comportant une plus forte proportion d'eau douce, on devrait utiliser du sel de mer.

Pour préparer de l'eau de mer reconstituée, on peut se servir d'eau désionisée, d'eau distillée, d'eau potable municipale déchlorée ou d'une réserve non contaminée d'eau de surface ou d'eau provenant d'une nappe phréatique. Si l'on se sert d'eau municipale ou d'eau douce naturelle, on devrait en déterminer la teneur en produits chimiques, comme ceux dont il est question au début de la présente subdivision, afin d'en évaluer leur qualité.

S'il faut utiliser de l'eau potable municipale pour préparer de l'eau de mer reconstituée, on doit assurer une déchloration efficace de l'eau, de sorte qu'elle soit exempte de toute concentration nocive de chlore. La teneur en chlore résiduel total de l'eau dans les réservoirs de garde et de l'eau de contrôle/ de dilution ne devrait pas dépasser 0,002 mg/L (CCMRE, 1987). Le chlore, même à des concentrations aussi faibles que 0,05 mg/L, possède une puissante action spermicide chez les échinides (Muchmore et Epel, 1973). Il est possible d'éliminer le chlore volatil de l'eau en aérant cette dernière vigoureusement. Il est recommandé d'utiliser des filtres au charbon activé (charbon d'os) et, ensuite, le rayonnement ultraviolet (Armstrong et Scott, 1974) pour éliminer la chloramine résiduelle et les autres composés organiques chlorés[4].

2.3.5 Température

Le tableau 1 indique, entre autres, la température de l'eau à laquelle il est recommandé de conserver les échinides, mais on peut également les garder à des températures saisonnières normales, par exemple à la température où l'eau de mer

---

3 La solution devra être composée de saumure à 33 % pour que sa salinité atteigne le niveau souhaité.

4 On ne doit pas ajouter de thiosulfate ou d'autres produits chimiques qui éliminent efficacement le chlore résiduel à l'eau de mer reconstituée qui sera utilisée comme eau de contrôle/de dilution dans les essais de toxicité, car ces produits pourraient avoir un effet sur la toxicité des échantillons.

naturelle parvient au laboratoire. Après avoir amené l'eau à la température choisie, on devrait l'y maintenir pendant au moins trois jours avant de faire frayer les animaux et d'utiliser leurs gamètes pour les essais. La température normalisée lors de la période précédant la ponte devrait être de 9 °C pour les oursins verts, de 12 °C pour les oursins violets du Pacifique ainsi que pour les deux espèces de clypéasters et de 15 °C pour l'oursin violet de l'Atlantique et l'oursin blanc[5].

On peut détenir des groupes d'adultes, en vue d'une ponte différée, à des températures inférieures aux normales saisonnières de leur habitat; les valeurs précises varient selon les espèces et la longueur du retard prévu. Il est également possible d'élever la température de façon à stimuler le développement des gamètes. On doit cependant éviter les températures trop élevées; on recommande de ne pas dépasser 12 °C pour les oursins verts, 17 °C pour les oursins violets du Pacifique et les clypéasters excentriques, 22 °C pour l'oursin violet de l'Atlantique et 24 °C pour les oursins blancs, espèce qui ne devrait pas être conservée à des températures inférieures à 8 °C. On peut amener la température au degré voulu mais sans franchir le seuil de 3 °C par jour.

2.3.6 Oxygène dissous

La teneur en oxygène dissous (OD) de l'eau des réservoirs de garde devrait se situer entre 80 et 100 % de saturation en air. On devrait, si cela devient nécessaire pour maintenir ce niveau d'OD, assurer une légère aération de l'eau au moyen d'air comprimé filtré et exempt d'huile. L'aération à l'aide de pierres de barbotage d'aquarium commercial contribue aussi à agiter l'eau. On devrait toutefois éviter une agitation trop violente.

2.3.7 pH

Le pH de l'eau de conservation des adultes devrait normalement être compris entre 8,0 et 8,2 et ne doit pas être inférieur à 7,5 ni supérieur à 8,5. L'eau de mer, dont le pH moyen se situe à 8,1 (Thurman, 1975), possède un pouvoir tampon considérable. Dans les eaux littorales, la salinité est toutefois moins élevée qu'en pleine mer et varie en fonction des eaux de ruissellement. Le pH de l'eau de mer non contaminée se situe normalement entre 7,5 et 8,5, qu'elle soit diluée ou à sa concentration maximale, mais n'atteint à peu près jamais ces valeurs extrêmes. Dans les méthodes actuelles d'essai de toxicité sur les échinides, aucune recommandation n'est formulée quant au pH des eaux utilisées pour la conservation des adultes (*cf.* annexe C).

2.3.8 Alimentation

Il faut nourrir les oursins de varech, de macroalgues (*Laminaria*, *Nereocystis*, *Macrocystis*, *Egregia*, *Hedophyllum*) ou de laitue romaine. On devrait renouveler assez fréquemment leur réserve de nourriture (chaque semaine ou chaque jour) et retirer du réservoir les vieux aliments ou ceux qui sont décomposés. On a pu garder des oursins en laboratoire pendant des années en les nourrissant de macroalgues. Certains auteurs (EVS, 1989) ont recommandé de leur donner du fucus alors que d'autres (Dinnel *et al.*, 1987) le déconseillent. Le

---

5 Au début de la saison de ponte, ou immédiatement avant, il pourrait être souhaitable de détenir les organismes à des températures un peu plus basses que celles indiquées afin de prévenir la ponte. On pourrait, par exemple, conserver les oursins blancs obtenus en mars à 12 °C plutôt qu'à 15 °C jusqu'au moment où on désire les faire pondre. On devrait demander conseil aux personnes chargées de recueillir les animaux à l'endroit qui nous intéresse.

fucus et d'autres algues brunes, comme *Alaria esculenta*, jouent un rôle important dans l'alimentation de l'oursin vert de Terre-Neuve (Himmelman et Steele, 1971). Au moment de déterminer s'il est préférable de choisir le fucus ou tout autre type d'aliments, le chercheur devrait se laisser guider par les préférences apparentes des animaux.

Les clypéasters ingèrent généralement de façon sélective les particules qui gisent au fond de l'eau et se nourrissent de différents déchets organiques, dont les microalgues. C'est pourquoi les sédiments naturels et non contaminés déposés au fond des réservoirs de garde des clypéasters devraient contenir de tels déchets et surtout des dépôts de plancton. Selon certains, les clypéasters tirent leur subsistance de microalgues, comme les diatomées, qui croissent à la surface des particules sédimentaires; un bon éclairage propice à la croissance de ces algues sur les sédiments peut donc favoriser la conservation à long terme des animaux. On peut également ajouter des algues de culture, au besoin (ASTM, 1990).

Il existe d'autres façons pratiques de nourrir les clypéasters. Ainsi, on pourrait ajouter de la zostère marine déchiquetée (*Zostera sp.*) ou même des épinards, une fois par semaine, pour que les animaux puissent se nourrir des détritus de ces plantes (EVS, 1989). Les aliments en flocons pour poissons peuvent être utilisés comme supplément (NCASI, 1991). On devrait toutefois éviter de laisser des aliments en décomposition dans les réservoirs.

2.3.9 Nettoyage des réservoirs

Il faudrait brosser et rincer les réservoirs avant d'y introduire un nouveau groupe d'adultes. On peut aussi utiliser des désinfectants, si on le désire, afin de diminuer les risques de transmission de maladies. Les désinfectants qui contiennent des composés chlorés, des composés iodophores ou du chlorure de n-alkyldiméthylebenzylammonium (p. ex., Comet^{MC}, Ovidine^{MC}, Argentyne^{MC}, Roccal^{MC}) conviennent à cet usage. Les désinfectants sont toxiques pour les organismes aquatiques et même une infime quantité pourrait se révéler nocive pour les échinides. Après désinfection, on doit rincer abondamment chaque réservoir avec l'eau utilisée pour la conservation des organismes.

Les réservoirs devraient toujours être raisonnablement propres. Chaque jour ou selon les besoins, on devrait retirer des réservoirs les macroalgues qui n'ont pas été consommées. On peut nettoyer périodiquement, à l'aide d'un siphon, les réservoirs d'oursins et de clypéasters afin d'éliminer les déchets en suspension et les matières fécales ou encore pour remplacer les sédiments. Par ailleurs, on pourrait laisser des morceaux de tests dans les réservoirs des oursins, car, lorsqu'ils sont en bonne santé, ces animaux ont l'habitude de se couvrir de ces fragments.

2.3.10 Maladies et mortalité

On devrait examiner les adultes quotidiennement afin de déceler les signes de maladie et retirer les organismes morts des réservoirs dès qu'on constate leur décès. Le taux de mortalité dans les groupes d'animaux destinés à produire des gamètes ne devrait pas dépasser 2 % par jour en moyenne pendant les sept jours précédant la collecte des gamètes.

Il faut également se débarrasser des animaux à l'agonie, des oursins qui présentent une perte importante de piquants et des clypéasters qui portent des plaques de champignons. On reconnaît généralement l'agonie d'un oursin à l'absence d'activité des pieds ambulacraires, à leur incapacité à

se retourner lorsqu'on les place sur le dos et en particulier à leur manque d'adhérence au substrat. Dans le cas des clypéasters, les signes d'agonie se manifestent surtout dans leur aspect et leur niveau d'activité : lorsque l'épiderme se désintègre, tout le test affiche une décoloration ou des taches claires et les animaux cessent de se recouvrir de sédiments. De plus, seul un examen attentif (à la loupe ou au microscope à dissection) permet de déceler la faible activité des pieds ambulacraires combinée à un amollissement des piquants et des pédicellaires (petits appendices en forme de pince situés sur certains pieds ambulacraires). Le test des clypéasters morts se couvre d'une couche visqueuse et tend à noircir.

On ne devrait pas tenter de traiter les adultes malades avec des produits chimiques; il est fortement recommandé de se départir des groupes d'animaux qui présentent un taux de morbidité très élevé.

Section 3

Système d'essai

3.1 Installations et appareils

Les essais doivent être réalisés dans des installations situées à l'écart des activités normales du laboratoire. Si on ne dispose pas d'une pièce isolée, on devrait empêcher la poussière et les émanations de pénétrer dans la zone d'essai.

Les matériaux de construction et toute pièce d'équipement qui risquent d'entrer en contact avec les solutions d'essai ou avec l'eau de contrôle/de dilution ne devraient contenir aucune substance susceptible de passer dans les solutions ou d'augmenter la capacité d'absorption et d'adsorption des substances d'essai (*cf.* 2.3.2). Le laboratoire doit être doté des instruments nécessaires à la mesure des variables fondamentales de la qualité de l'eau (la température, la salinité et la conductivité, l'oxygène dissous et le pH) et permettre l'analyse rapide et précise d'autres variables comme la teneur en ammoniac.

La température de toutes les solutions d'essai ne devrait pas s'écarter de plus de 1 °C de la température souhaitée. Pour maintenir cette température, on peut utiliser divers appareils, par exemple un bain d'eau à température constante dans lequel on immerge les récipients contenant les solutions.

3.2 Éclairage

L'éclairage normal du laboratoire suffit pour les essais.

3.3 Récipients contenant les solutions d'essai

Au départ, on peut choisir d'utiliser 10, 5 ou 2 mL de solution d'essai et on doit donc prévoir des récipients dont la capacité correspond au volume choisi. Ces volumes sont représentatifs de la gamme généralement utilisée dans les méthodes publiées (*cf.* annexe C). Un volume de 10 mL de solution est considéré comme caractéristique et les plus petits volumes sont réservés à des usages spéciaux (*cf.* introduction de la section 4).

Les flacons ou les éprouvettes doivent être en verre borosilicaté. On recommande de se servir de contenants d'une capacité de 20 mL pour les solutions d'essai de 10 mL, ce qui correspond d'ailleurs à la pratique courante (*cf.* tableau C.8). Pour les plus petits volumes de solution, on recommande d'utiliser des contenants dont la capacité correspond au double, ou un peu plus, du volume de solution utilisé, par exemple des contenants de 5 mL pour 2 mL de solution. On peut toutefois utiliser de plus grands flacons si on le désire; ainsi, on place parfois 2 mL de solution dans des flacons d'une capacité allant jusqu'à 13 mL (*cf.* annexe C). Il est préférable qu'un laboratoire utilise

systématiquement des récipients de volumes déterminés[6].

Les récipients devraient être munis d'un bouchon ou de toute autre sorte de dispositif de fermeture afin de prévenir les risques de contamination des solutions par l'air ambiant et la perte de composés volatils. On pourrait se servir d'une pellicule en plastique pour couvrir tous les contenants utilisés pour l'essai. Ces récipients devraient être à usage unique, neufs et n'avoir jamais été nettoyés. Il est également possible de réutiliser des éprouvettes à condition de les laver et de les rincer à fond avant usage; cette méthode n'est toutefois pas recommandée car il semble qu'elle donne lieu à une toxicité mesurable[7].

Le choix du style et de la forme des récipients d'essai offre une grande latitude. Toutefois, pour tous les traitements d'un essai donné, on doit se servir de récipients de type, de taille et de forme identiques. On déconseille les contenants en plastique car il a été démontré qu'ils réduisent le taux de fécondation (Dinnel *et al.*, 1987). Les contenants utilisés dans les méthodes décrites à l'annexe C sont pour la plupart à usage unique, munis de bouchons et en verre borosilicaté (p. ex., en Pyrex^{MC}). On les appelle *flacons à scintillation*, *éprouvettes de culture*, *éprouvettes d'essai* ou simplement *éprouvettes* ou *flacons*; ces types de récipients semblent donner un bon rendement dans la mesure où leur capacité est appropriée aux conditions d'essai.

3.4 Eau de contrôle/de dilution

Selon la substance d'essai utilisée et les objectifs de l'essai (*cf.* sections 5 à 8), on peut se servir d'eau de mer naturelle non contaminée, d'eau de mer reconstituée ou d'un échantillon d'eau réceptrice prélevé en amont de la source de contamination comme eau de contrôle/de dilution. Si on utilise un milieu récepteur, les conditions de prélèvement, de transport et de stockage devraient être conformes aux indications de la sous-section 6.1. Toutes les eaux marines, y compris les réserves en eau de mer naturelle du laboratoire, utilisées comme eau de contrôle/de dilution devraient être passées à travers un filtre dont les pores ont un diamètre d'environ 1 µm.

La salinité de l'eau de contrôle/de dilution devrait être de 30 g/kg et ne doit pas être inférieure à 28 g/kg ni supérieure à 34 g/kg. On pourrait augmenter la salinité en ajoutant de la saumure ou du sel de mer (*cf.* 2.3.4) et

---

6 En entraînant une modification de la profondeur relative, de la surface du liquide et d'autres paramètres, les variations de la taille des récipients ont sur les résultats d'essai une influence qui demeure encore inexpliquée. Au moment de la publication du présent document, il ne semble pas y avoir de consensus sur la taille exacte des récipients que l'on doit utiliser. Si l'on en arrivait à un tel consensus, les chercheurs devraient s'y conformer de façon à réduire au minimum les effets potentiels associés à la taille et aux proportions des récipients.

7 Dinnel *et al.* (1987) ont évalué les modes de préparation des différents types de flacons. La fécondation s'est révélée excellente dans les éprouvettes en verre borosilicaté non lavées, et aucune fécondation ne s'est produite dans les éprouvettes en verre lavées à l'acide et rincées (ce qui indique une toxicité très élevée). On a observé un taux de fécondation très faible dans les éprouvettes non lavées en polystyrène et en polyéthylène, et légèrement supérieure dans les éprouvettes en plastique lavées, bien que ces dernières donnent un rendement satisfaisant pour la culture de tissus. Certains laboratoires ont observé une faible incidence de toxicité dans quelques lots d'éprouvettes neuves et non lavées, mais la plupart des lots ne montraient aucun signe de toxicité.

la réduire en ajoutant de l'eau désionisée ou de l'eau douce non contaminée[8].

Le pH de l'eau de contrôle/de dilution doit se situer entre 7,5 et 8,5 et devrait normalement être de 8,0 à 8,2. On devrait généralement obtenir ces valeurs grâce au pouvoir tampon naturel de l'eau de mer. Si ce n'est pas le cas, on devrait ajuster le pH en ajoutant un acide ou une base (*cf.* 4.3.4).

On doit amener l'eau de contrôle/de dilution à la température d'essai avant de l'utiliser. On doit également veiller à ce qu'elle ne soit pas sursaturée en gaz (*cf.* 2.3.4) et qu'elle présente une teneur en oxygène dissous variant de 90 à 100 % de saturation en air. Pour atteindre cette valeur, on peut, au besoin, aérer l'eau à l'aide d'air comprimé exempt d'huile ayant traversé des pierres de barbotage.

---

8 Il est possible que les gamètes de certaines espèces ou de toutes les espèces soumises à l'essai puissent tolérer des salinités hors de la plage recommandée (*cf.* 4.3.2 et la note en bas de page correspondante), en particulier des salinités plus élevées se rapprochant de la salinité moyenne des océans, soit environ 35 g/kg. En fait, il est probable que des salinités élevées, de 34 ou 35 g/kg, soient moins dommageables que des salinités réduites se situant autour de 28 à 30 g/kg. Les plages de salinité recommandées dans le présent document ont été établies en fonction de la salinité naturelle des océans et des valeurs préconisées dans les méthodes d'essai sur les échinides, c'est-à-dire qui se situent, pour la plupart, à environ 30 g/kg (*cf.* annexe C).

Section 4

Méthodes d'essai universelles

Les méthodes décrites dans la présente section s'appliquent à tous les essais portant sur les produits chimiques et les eaux résiduaires décrits aux sections 5, 6, 7 et 8. Tous les éléments du système d'essai décrit à la section 3 doivent être incorporés dans ces méthodes d'essai universelles. La liste de contrôle dans laquelle sont résumées les conditions et les méthodes recommandées, présentée au tableau 3, comprend non seulement les méthodes universelles mais aussi celles qui conviennent à des substances d'essai particulières.

Les méthodes d'essai générales proposées ici comportent certaines variantes dont trois durées d'exposition. Dans le premier cas, du sperme est d'abord exposé pendant 10 minutes, puis pendant 10 autres minutes après que des oeufs aient été mis en place. Cette durée d'exposition type est celle qui est généralement recommandée. Elle réduirait au minimum le vieillissement des gamètes pendant un essai ou une série d'essais. Une courte période d'exposition conviendrait parfaitement aux programmes d'essais d'envergure qui comportent plusieurs essais visant, par exemple, l'identification de composés toxiques d'un effluent complexe (programmes EIT). Elle permettrait ainsi de procéder à de nombreuses manipulations de l'effluent avant que les gamètes n'aient vieilli de façon notable.

Dans une deuxième variante, du sperme est d'abord exposé pendant 20 minutes, puis pendant 20 autres minutes après la mise en place d'oeufs. Cette option peut être retenue lorsqu'on désire comparer des résultats ou des méthodes d'essai (*cf.* annexe C). La troisième variante comporte une période d'exposition plus longue, soit de 60 min pour du sperme et de 20 min pour du sperme et des oeufs; elle convient aux essais qui nécessitent une sensibilité maximale. Elle entraîne toutefois une augmentation de la variabilité des résultats (*cf.* 4.2.4).

On peut également choisir entre trois volumes de solutions d'essai : 10, 5 ou 2 mL de chacune des concentrations de l'échantillon. Les chercheurs canadiens utilisent généralement un volume type de 10 mL. Un volume relativement important devrait être plus facile à manipuler et peut permettre d'obtenir un degré de précision plus élevé que de petits volumes. Les essais réalisés avec de petits volumes nécessitent toutefois une production réduite de gamètes et, par conséquent, un moins grand nombre d'adultes, de même qu'un bain-marie ou un bain à température constante moins grand. De petits volumes peuvent convenir à certaines études comme les essais sur les effluents d'usines pilotes, notamment, dans le cadre d'un programme EIT.

4.1 Préparation des solutions d'essai

On doit nettoyer et rincer à fond tous les récipients, appareils de mesure, dispositifs d'agitation et seaux utilisés pour transférer les organismes, conformément aux méthodes normalisées. Il faudrait utiliser de l'eau de contrôle/de dilution pour le dernier rinçage de tous les éléments devant servir à l'essai et ce, immédiatement avant leur utilisation. On devrait utiliser de l'eau distillée ou désionisée pour le dernier rinçage des

instruments destinés à être entreposés après le séchage.

4.1.1 Eau de contrôle/de dilution

Il faut utiliser la même eau de contrôle/de dilution pour la préparation du contrôle et de toutes les concentrations des substances d'essai. On devrait mélanger toutes les solutions d'essai à l'aide d'une tige de verre, d'un agitateur en Teflon[MC] ou de tout autre instrument non réactif. La température des solutions ne devrait pas s'écarter de plus de 1 °C de la température recommandée pour l'essai. Il peut être nécessaire d'ajuster la salinité ou le pH des échantillons de substance d'essai ou des solutions d'essai (*cf.* 4.3.2 et 4.3.4) ou encore de procéder à une aération préliminaire (*cf.* 4.3.3).

Si on utilise de l'eau de mer reconstituée comme eau de contrôle/de dilution, on devrait s'assurer de l'homogénéité des solutions ainsi préparées et les laisser reposer une ou deux semaines avant de les utiliser (Venables, 1986). Si on ajoute du sel, il faudrait agiter l'eau doucement pendant au moins 60 min (de préférence à l'aide d'un agitateur magnétique) afin de s'assurer de la dissolution du sel. On devrait laisser reposer l'eau de mer reconstituée dans un récipient propre et couvert, à la température d'essai et l'aérer. Il faudrait contrôler la salinité pendant l'agitation et la période de repos afin de s'assurer qu'elle correspond aux valeurs souhaitées et qu'elle est stable.

Si l'on doit stocker l'eau de mer naturelle, on devrait la conserver à une température égale ou inférieure à la température d'essai et l'utiliser dans un délai de trois jours.

On devrait filtrer l'eau de contrôle/de dilution afin d'en éliminer les particules qui pourraient fausser le décompte de spermatozoïdes; cette mesure est particulièrement importante lorsqu'on se sert d'eau de mer naturelle. On recommande l'utilisation d'un filtre dont les pores ont un diamètre d'environ 1 µm, capable de retenir la plupart des solides en suspension (*cf.* sous-section 6.2). L'eau filtrée ne devrait pas être conservée plus de trois jours.

On utilise parfois de l'eau réceptrice comme eau de contrôle/de dilution afin de simuler certaines conditions locales comme le déversement d'effluents et de produits chimiques ou la pulvérisation de pesticides. Si l'on choisit ce procédé, on doit préparer une deuxième solution de contrôle à partir de l'eau de mer dans laquelle on a conservé les adultes (*cf.* 4.1.4). Il ne faut toutefois pas utiliser l'eau réceptrice d'amont si elle est manifestement toxique et si les résultats obtenus avec la solution de contrôle ne sont pas valides, selon les critères qui régissent cet essai sur la fécondation[9]. Dans un tel cas, on devrait avoir recours à de l'eau de

---

9 De faibles concentrations de contaminants déjà présents dans le milieu récepteur peuvent, sans avoir une incidence directe sur les contrôles, ajouter à la toxicité des substances à l'essai. En pareil cas, de l'eau de dilution non contaminée (eau de mer reconstituée ou naturelle) permettrait d'évaluer avec une plus grande précision la toxicité de la substance étudiée, mais entraînerait probablement une sous-estimation des répercussions réelles sur le site en cause.

Si l'objectif de l'essai consiste à déterminer l'effet d'une substance particulière sur un milieu récepteur donné, il importe peu que les produits toxiques présents dans l'eau réceptrice modifient la toxicité des échantillons ou que d'autres substances, comme les acides humiques, réduisent les effets toxiques. Lorsque le milieu récepteur ajoute à la toxicité des échantillons, il conviendrait d'utiliser au moins un autre contrôle constitué d'eau de mer du laboratoire ou d'eau de mer reconstituée et, au plus, une deuxième série de concentrations de la substance diluée avec de l'eau propre.

Tableau 3 Liste de contrôle des conditions et méthodes recommandées

Méthodes universelles

Type d'essai	Statique; exposition du sperme pendant 10 min suivie d'une exposition du sperme et des oeufs de la même durée aux fins de fécondation; autres périodes d'exposition : 20 + 20 min ou 60 + 20 min.
Eau de contrôle/ de dilution	Eau de mer non contaminée du laboratoire; eau de mer reconstituée; eau réceptrice d'amont pour évaluer l'effet toxique d'un endroit particulier et eau de mer du laboratoire pour le contrôle; filtrer (1,0 µm) avant usage; teneur en oxygène dissous (OD) : de 90 à 100 % au moment de l'utilisation; salinité de 28 à 34 g/kg, de préférence 30 g/kg; pH de 7,5 à 8,5, de préférence entre 8,0 et 8,2.
Organismes	Chaque récipient contenant les solutions d'essai reçoit environ 2 000, 1 000 ou 400 oeufs selon le volume choisi pour les solutions d'essai; le rapport spermatozoïdes:oeuf est déterminé par voie d'essai, soit celui qui produit un taux de fécondation de 90 % dans la solution de contrôle, se situe normalement entre 200:1 et 2 500:1 mais il pourrait être plus élevé en certaines saisons.
Répétitions	Il faut préparer au moins trois répétitions de chaque concentration d'essai, de préférence, quatre.
Récipient et solution	Volume type de 10 mL de solution d'essai ou, autrement, de 5 ou de 2 mL; récipients en verre borosilicaté munis de bouchons ou de couvercles.
Température	Pour les espèces indigènes (oursin vert, oursin violet du Pacifique, clypéaster excentrique, 15 °C, et, pour l'oursin violet de l'Atlantique et l'oursin blanc, 20 °C; la température des récipients ne doit pas s'éloigner de ces valeurs de plus de 1 °C.
Salinité	Salinité type de 30 g/kg (entre 28 et 34 g/kg); la salinité de toutes les solutions d'essai doit se situer dans cette plage et ne pas s'éloigner de la salinité du contrôle de plus de 1 g/kg; ajuster au besoin avec de la saumure, du sel de mer, de l'eau douce désionisée ou non contaminée; la salinité des échantillons d'effluent, de lixiviat, d'eau réceptrice, d'élutriat ou d'autres produits aqueux extraits de sédiments devrait être ajustée en fonction de la salinité de l'eau de contrôle/de dilution; si on désire évaluer la toxicité globale des eaux résiduaires, y compris leur salinité, on pourrait réaliser un essai sans ajuster la salinité, dans la mesure où l'on procède par la suite à un deuxième essai sur une solution ajustée ou à un contrôle de la salinité, ou encore combiner ces deux méthodes.

Tableau 3 Liste de contrôle des conditions et méthodes recommandées (suite)

Oxygène/ aération	Pas de préaération des aliquotes d'un échantillon ou d'une solution d'essai (p. ex., un effluent) à moins que la teneur en OD soit inférieure à 40 % ou supérieure à 100 % de saturation; dans ce cas, aérer une aliquote de l'échantillon pendant au plus 20 min au taux minimal efficace avant de préparer des concentrations et de commencer l'essai.
pH	Les essais réglementaires ou de contrôle ne nécessitent pas un ajustement du pH de l'échantillon ou de la solution; pour d'autres types d'essai, il peut être nécessaire d'ajuster le pH ou de réaliser un deuxième essai sur des solutions ajustées; un pH se situant entre 7,5 et 8,5, de préférence entre 8,0 et 8,2, permet de réduire au minimum les effets du pH sur les gamètes et augmente la sensibilité de l'essai aux substances chimiques.
Éclairage	Éclairage normal du laboratoire.
Observations	Pourcentage d'oeufs fécondés parmi 100 ou 200 oeufs prélevés dans chaque récipient et examinés au microscope.
Mesures	Température, salinité, pH et OD au début de l'exposition, pour toutes les aliquotes de solutions d'essai, de concentration élevée, moyenne ou faible, et pour le contrôle.
Résultats	De préférence CI_{25} pour la CSEO et la CMEO du taux de fécondation pour les essais portant sur plusieurs concentrations; dans les essais portant sur une seule concentration : pourcentage de fécondation et comparaison avec le contrôle.
Produits toxiques de référence	On recommande le cuivre; établir la CSEO, la CMEO ou la CI_p au moins une fois par mois lorsqu'on s'en sert dans des essais.
Validité de l'essai	Le taux de fécondation moyen dans le contrôle doit être supérieur ou égal à 50 % et inférieur à 100 %.
Produits chimiques	
Solvants	À utiliser uniquement dans des cas particuliers. Concentration maximale de 0,1 mL/L.
Concentration	On recommande d'effectuer des mesures au début de l'essai dans les aliquotes de concentration faible, moyenne et élevée ainsi que dans le ou les contrôles.

Tableau 3 Liste de contrôle des conditions et méthodes recommandées (suite)

Eau de contrôle/ de dilution	Selon les indications ou les objectifs; on utilise de l'eau de mer reconstituée si on désire une forte normalisation, de l'eau réceptrice si on désire évaluer l'effet toxique local et de l'eau de mer du laboratoire dans tous les autres cas.
Effluents, lixiviats et élutriats	
Volume de l'échantillon	Deux litres devraient suffire à l'essai et aux analyses chimiques de routine.
Transport et stockage	Si elle est chaude (plus de 7 °C), ramener la température entre 1 et 7 °C au moyen de glace ou de sachets réfrigérants; transporter dans l'obscurité à une température de 1 à 7 °C (de préférence à 4 ± 2 °C) obtenue grâce à des sachets réfrigérants; stocker dans l'obscurité à 4 ± 2 °C; les échantillons ne doivent pas geler; dans la mesure du possible, l'essai de l'échantillon devrait être entrepris dans les 24 h et doit démarrer au plus tard dans les 72 h qui suivent le prélèvement; l'extraction du sédiment devrait être réalisée dans les deux semaines qui suivent le prélèvement et, au plus tard, dans les six semaines après cette date.
Eau de contrôle/ de dilution	Selon les indications ou les objectifs de l'essai; eau de mer du laboratoire ou eau réceptrice d'amont pour des essais de contrôle et de conformité.
Solides en suspension	Le traitement type consiste à filtrer (5 µm) un échantillon; si on craint de diminuer la toxicité en éliminant les solides, on peut réaliser un autre essai avec un échantillon non filtré.
Milieux récepteurs	
Volume de l'échantillon	Comme pour les effluents, les lixiviats et les élutriats.
Transport et stockage	Comme pour les effluents, les lixiviats et les élutriats.
Eau de contrôle/ de dilution	Selon les indications ou les objectifs de l'essai; pour étudier l'effet toxique local, utiliser de l'eau réceptrice d'amont.

Tableau 3 Liste de contrôle des conditions et méthodes recommandées (suite)

Sédiments et solides similaires	
Transport et stockage	Même température que pour les effluents et les lixiviats; l'essai des sédiments devrait être entrepris dans les deux semaines et doit débuter au plus tard dans les six semaines qui suivent le prélèvement.
Préparation et essai	Les échantillons aqueux extraits des sédiments devraient être traités comme des effluents, des lixiviats et des élutriats; il faudrait équilibrer la concentration de solvant des échantillons extraits et le solvant; cet essai ne convient pas aux solides.
Sédiments de référence	Aux fins de l'essai parallèle mené sur des sédiments non contaminés ou dont les propriétés physico-chimiques sont similaires à celles du sédiment étudié.
Eau de contrôle/ de dilution	Comme pour les effluents, les lixiviats et les élutriats.

mer reconstituée (*cf.* 2.3.4) ou à de l'eau de mer naturelle du laboratoire. On pourrait également utiliser l'eau du laboratoire s'il est impossible de prélever et d'utiliser de l'eau réceptrice[10].

4.1.2 Concentrations

Dans le cadre d'essais visant à évaluer la CSEO/CMEO ou la CI_p, ou ces deux paramètres, on doit préparer au moins cinq concentrations de la solution d'essai et une solution de contrôle (constituée uniquement d'eau de contrôle/de dilution). On peut utiliser une progression géométrique de concentrations, dans laquelle la concentration de chaque solution équivaut à la moitié de celle de la précédente (p. ex., 100, 50, 25, 12,5, 6,3). On peut également choisir d'utiliser d'autres séries logarithmiques de concentrations convenant à l'essai (*cf.* annexe E). L'utilisation d'une plage étroite de concentrations n'apporte généralement pas plus de précision dans les résultats des essais que l'utilisation d'échelles de concentrations établies par un facteur 0,5. Dans les essais de routine, l'écart entre les concentrations ne devrait pas être supérieur à celui obtenu par un facteur de 0,3 (p. ex., des concentrations de 100, 30, 9, etc.) au risque d'obtenir une faible précision dans l'estimation de la toxicité. On peut toutefois utiliser un écart plus grand entre les concentrations si on a des doutes importants quant aux niveaux de toxicité.

On prépare d'abord chacune des concentrations et on ajoute aux récipients d'essai le volume choisi (10, 5 ou 2 mL). Les concentrations nominales de la solution

10 On pourrait préparer une solution s'approchant considérablement du milieu récepteur en corrigeant la salinité (et peut-être le pH) de l'eau de mer du laboratoire ou de l'eau de mer reconstituée. Selon la situation, on peut amener ces paramètres à des niveaux correspondant à certaines valeurs ou moyennes saisonnières. On peut faire les corrections grâce aux méthodes indiquées à la subdivision 2.3.4.

(ou concentrations mesurées, *cf.* sous-section 5.4) sont utilisées comme concentrations d'essai. La légère diminution de la concentration imputable à l'ajout des aliquotes de sperme en suspension est négligeable[11]. La concentration nominale à laquelle le sperme est exposé est adoptée pour tout l'essai. La concentration diminue de 9 % dans la dernière partie de l'essai, lorsque l'on ajoute les oeufs en suspension mais, dans le but de caractériser l'essai, on utilise les concentrations initiales auxquelles le sperme a été exposé[12].

Si on doute considérablement de la toxicité de l'échantillon, il peut être utile de procéder à un essai en vue de déterminer l'ordre de grandeur ou à un essai d'élimination dans le seul but de déterminer les concentrations à utiliser pour l'essai sur la fécondation. On peut alors réduire considérablement les possibilités de conditions et de méthodes d'essai. L'utilisation d'une large plage de concentrations (p. ex., au plus 100 fois supérieure) devrait faciliter le choix de concentrations pour l'essai réel.

On pourrait se servir d'essais utilisant une seule concentration à des fins réglementaires (p. ex., pour des essais à résultat unique). Dans ce cas, il faudrait normalement utiliser une concentration arbitraire ou recommandée de substance chimique ou encore un effluent, un lixiviat, un milieu récepteur, un élutriat ou un autre extrait aqueux provenant de sédiments ou d'autres solides similaires; ils ne doivent pas être dilués. L'utilisation de contrôle devrait suivre les même règles que pour les essais portant sur plusieurs concentrations. Ce document ne décrit pas les essais portant sur une seule concentration, mais les méthodes sont évidentes, et tous les conseils donnés ici s'appliquent dans ce cas, sauf en ce qui concerne l'essai portant sur une seule concentration et sur un seul contrôle.

4.1.3 Répétition de l'essai

On doit préparer au moins trois répétitions de chaque concentration ainsi que trois solutions de contrôle afin de pouvoir procéder à l'analyse statistique des résultats, en particulier au moyen du test de Dunnett (Gulley *et al.*, 1989). Il est recommandé de préparer quatre répétitions de chaque concentration; on pourrait de cette façon procéder à une épreuve statistique non paramétrique si les résultats de l'essai ne satisfont pas aux critères de normalité et d'homogénéité applicables à l'essai[13]. Au

---

11 En réalité, le sperme est exposé à une concentration qui équivaudrait à 99 % de la concentration initiale de la substance d'essai, car on ajoute 0,1 mL de la suspension de sperme à 10 mL de la solution d'essai, et on produit une quantité proportionnelle aux solutions de volume inférieur. Si, par exemple, on évaluait la toxicité d'un effluent non dilué contenu dans un récipient, le sperme serait exposé à une concentration correspondant à $10/10{,}1 \times 100\ \% = 99\ \%$. Cette légère différence est tenue pour négligeable.

12 Dans certains cas, le sperme est plus sensible que les oeufs, et la concentration pendant l'exposition du sperme peut donc être considérée comme le facteur déterminant. Un essai sur la fécondation chez les échinides (Cherr *et al.*, 1987) indique que les composés toxiques des effluents des usines de pâte de papier kraft blanchie ont plus d'effets sur le sperme que sur les oeufs. Kobayashi (1984) a passé en revue ses propres travaux et ceux d'autres auteurs pour conclure que les gamètes mâles sont souvent l'élément le plus sensible qui détermine le succès de la fécondation et du développement embryonnaire.

13 Ces exigences applicables aux répétitions sont généralement conformes aux directives présentées dans les documents cités à l'annexe C. Cinq auteurs recommandent de réaliser l'essai sur trois répétitions et quatre autres conseillent d'utiliser au moins trois répétitions, certains reconnaissant qu'il faut quatre répétitions pour procéder à une analyse statistique non paramétrique. Dans les cinq autres méthodes, on ne précise pas le nombre de répétitions.

début de l'essai, on doit disposer d'un nombre égal de répétitions de chaque concentration, y compris des concentrations de contrôle. En cas de perte accidentelle d'une solution répétée au cours de l'essai, on ne pourra analyser les séries inégales de résultats avec toute la précision souhaitée (Gulley *et al.*, 1989).

4.1.4 Contrôles

Dans tous les essais, il faut exposer la solution de contrôle, constituée de l'eau de contrôle/de dilution utilisée pour préparer les concentrations de la substance d'essai. On doit disposer d'un nombre égal de répétitions de contrôle et de répétitions de solutions d'essai, c'est-à-dire au moins trois.

Si, pour quelque raison que ce soit, la salinité des solutions d'essai se situe hors de la plage préconisée, de 28 à 34 g/kg, on devrait faire un essai de contrôle de la salinité sur des solutions de contrôle. Si, par exemple, des échantillons constitués essentiellement d'eau douce (dont la salinité maximale est de 5 g/kg) ont été soumis à l'essai sans ajustement de la salinité, on devrait préparer des solutions témoins pour le contrôle de la salinité en ajoutant à une série de récipients de l'eau distillée, dans les mêmes proportions que pour les solutions d'essai. Ainsi, les solutions de contrôle n'indiquent que l'effet d'une faible salinité si l'on ne tient pas compte de l'exacerbation de l'effet qui résulte de l'interaction entre les quantités réduites de sel et les substances toxiques de l'échantillon (*cf.* 4.3.2).

Si on doit avoir recours à un solvant pour l'essai d'un produit chimique très peu soluble, on devra alors préparer des solutions témoins permettant de contrôler l'effet du solvant; la concentration de solvant des solutions de contrôle doit être équivalente à la plus forte concentration de solvant que l'on puisse trouver dans les solutions d'essai.

Lorsqu'on a recours à une eau réceptrice comme eau de contrôle/de dilution, on doit préparer une deuxième série de solutions de contrôle à partir de l'eau de mer du laboratoire dans laquelle ont été conservés les échinides (*cf.* 2.3.4).

Il n'est pas nécessaire d'utiliser d'autres types de contrôles, bien que ces derniers puissent contribuer à l'évaluation de la qualité des résultats de l'essai. Une solution de contrôle de faible densité du sperme, par exemple, ne contiendrait que la moitié du nombre de spermatozoïdes utilisés pour l'essai et permettrait de déceler une surconcentration spermatique, problème courant dans cet essai. Si on obtient un taux de fécondation supérieur à 90 % avec la solution de contrôle type, le taux de fécondation dans la solution de contrôle de faible densité doit être inférieur à cette valeur de 5 %; un taux plus élevé indique une surconcentration spermatique associée à une faible sensibilité de l'essai. Un contrôle du produit toxique et des oeufs, dit «à blanc», contient une forte concentration du produit toxique mais pas de sperme; il permet de savoir si le produit entraîne la formation de fausses membranes de fécondation. Un témoin à blanc contient des oeufs mais pas de sperme et permet de déceler une contamination éventuelle des oeufs par le sperme (Chapman, 1991).

4.2 Mise en route et réalisation de l'essai

On doit faire pondre les échinides afin de recueillir la semence contenant des spermatozoïdes. Il faut combiner la semence de tous les organismes avant de commencer l'essai. On procède de la même façon pour les oeufs. Du sperme est exposé pendant 10, 20 ou 60 min à la substance d'essai placée dans chaque récipient. On ajoute ensuite un

nombre approprié d'oeufs dans chaque récipient et on maintient l'exposition pendant 10 ou 20 min pour permettre la fécondation. Finalement, on ajoute un agent de conservation dans tous les récipients pour mettre fin à l'exposition.

4.2.1 Collecte des gamètes en vue de l'essai

Le sperme devrait provenir d'au moins trois échinides mâles adultes de l'espèce choisie et les oeufs, d'au moins trois femelles. Étant donné que le sperme ou les oeufs d'un organisme donné peuvent être particulièrement sensibles ou tolérants, on doit chercher à obtenir des lots de gamètes qui soient homogènes entre eux, afin d'éviter des variations qui auraient les parents pour origine. Pour ce faire, il est conseillé, pour des raisons d'ordre pratique, de combiner les gamètes mâles ou femelles provenant de parents différents avant de les introduire dans les récipients d'essai. On utilisera, dans la mesure du possible, des gamètes provenant de trois adultes mâles et de trois adultes femelles[14].

On stimule la ponte chez les adultes en leur injectant du chlorure de potassium[15]. On injecte aux oursins 1 mL d'une solution de 0,5 *M* de KCl à travers la membrane du péristome, dans le coelome (*cf.* figure 2). Dans le cas des clypéasters, on injecte, à un angle, 0,5 mL de la même solution dans la bouche. Une seringue à tuberculine de 25 mm de diamètre convient parfaitement. On peut aussi, dans le cas de l'oursin violet de l'Atlantique, stimuler le test pendant 30 secondes grâce à des électrodes dans lesquelles passe un courant continu de 12 volts.

La technique privilégiée pour le prélèvement du sperme est connue comme la «collecte à sec». L'une des techniques de collecte à sec de semen consiste à placer un oursin mâle adulte, face aborale vers le bas, dans un bécher ou une boîte de Petri rincé à l'eau de contrôle/de dilution. On recueille ensuite la semence au fond du contenant (plutôt qu'à la surface de l'animal). Il existe une autre technique par laquelle les mâles reposent sur la face orale dans un bécher et sont légèrement recouverts de l'eau de contrôle/de dilution. La semence exsudée par les pores qui s'accumule à la surface de l'organisme est recueillie à l'aide d'une micropipette. La semence est ensuite déposée dans une éprouvette munie d'un bouchon ou d'un couvercle puis conservée sur glace. On peut procéder de la même façon pour recueillir les oeufs, mais ceux-ci doivent être lavés avant d'être entreposés conformément aux indications ci-dessous.

Les clypéasters excentriques mâles ne produisent pas de quantités suffisantes de sperme lorsqu'on utilise la technique de collecte à sec. Les clypéasters peuvent pondre dans un volume d'eau minime (5 mL). Cependant, on peut les suspendre

---

14 Il existe un moyen de s'assurer de la qualité des résultats d'essai : après avoir recueilli et examiné les gamètes d'au moins cinq adultes, on choisit et rassemble les lots qui semblent les plus viables. Pour ce faire, on conserve séparément le sperme de chaque organisme sur de la glace. On en dilue une petite quantité avec de l'eau de contrôle/de dilution et l'on place le mélange sur une lame pour évaluer au microscope la mobilité des spermatozoïdes. On combine et on utilisera les trois échantillons contenant les spermatozoïdes les plus actifs. On procède de la même façon pour les oeufs dont on élimine les échantillons lorsque ceux-ci sont petits, de forme irrégulière ou vacuolisée. Les oeufs de bonne qualité provenant d'au moins trois adultes seront combinés et utilisés pour l'essai. S'il est impossible d'obtenir des gamètes de qualité de trois adultes, on devrait utiliser un nombre réduit de lots. Selon Chapman (1992), la haute qualité des gamètes est plus importante que leur combinaison.

15 Pour préparer une solution de KCl de 0,5 *M*, il faut ajouter 3,75 g de KCl à 100 mL d'eau distillée ou d'eau désionisée.

au-dessus de la colonne d'eau. (L'expérience nous indique que les clypéasters ne pondront pas si leur face aborale est en contact direct avec le fond d'une boîte de Petri rincée à l'eau de mer.)

Si on décide de faire pondre les animaux dans de l'eau, on fait reposer chaque oursin ou clypéaster sur sa face aborale, dans un petit bécher d'une capacité de 50 à 250 mL, ou d'une taille appropriée, entièrement rempli d'eau de contrôle/de dilution à la température d'essai. Lorsque la ponte est terminée, on sépare par gravité l'eau des gamètes.

Si la ponte ne se produit pas entre 5 à 10 min après la première injection, on peut faire une seconde injection. L'adulte devrait produire la semence ou les oeufs sous la forme d'un filet continu, moins d'une demi-heure après la dernière injection. Lorsqu'on place les gamètes dans de l'eau, le sperme prend l'aspect d'un filet dense et blanc alors que les oeufs ont un aspect granulaire, généralement de couleur pastel (rosâtre chez les clypéasters). Il arrive parfois que des produits colorés soient exsudés avant ou pendant la ponte, mais ils ne doivent pas être confondus avec les gamètes.

La collecte de la ponte devrait prendre fin 15 min après le commencement de l'exsudation constante de gamètes. Les différents prélèvements de gamètes provenant du même organisme sont normalement combinés à l'aide d'une pipette. De nombreux chercheurs se servent, pour la manipulation des oeufs, de micropipettes en plastique, d'une capacité de 1 mL, qu'ils amputent de 2 à 3 mm à l'aide d'un scalpel afin d'obtenir un diamètre de 1 mm et de réduire ainsi les risques de dommage aux oeufs.

La semence prélevée à sec peut être conservée sur glace pendant 4 h avant d'être «activée» dans de l'eau de mer; elle doit alors être utilisée dans un délai de 30 à 120 min[16]. Si on recueille le sperme dans des béchers remplis d'eau de mer, on devrait commencer l'essai entre une demi-heure et deux heures après la fin de la collecte. Dans l'intervalle, il faut l'entreposer dans une quantité minime d'eau, sur de la glace.

---

16 Lorsqu'il entre en contact avec l'eau de mer, le sperme subit une série de changements métaboliques qui lui permettent de mener à bien le processus de fécondation. À l'activation succèdent une période d'activité intense d'une heure ou moins, puis une perte graduelle de vitalité au cours des 6 à 9 h qui suivent, cette détérioration étant plus rapide en eau chaude (Dinnel *et al.*, 1987). Certaines études montrent une grande variabilité des résultats lorsque le sperme est conservé dans de l'eau de mer avant l'essai. Un essai de toxicité des effluents des usines de pâte de papier kraft blanchie sur la fécondation chez les clypéasters excentriques indiquait qu'un essai de 80 min précédé d'une période de 60 min de «préactivation» du sperme dans de l'eau de mer produisait un coefficient de variation de 91 % contre 38 % dans le cas d'un essai sans préactivation. De plus, la préactivation augmentait la sensibilité de l'essai par un facteur de 1,6, ce qui représente un faible changement par rapport à l'augmentation du coefficient de variation (NCASI, 1992).

On peut réduire la période d'activation du sperme et ainsi augmenter la durée utile de l'essai, en gardant la semence au froid (sur de la glace), dans les mêmes conditions que lors de la collecte à sec. Aux fins de normalisation, on conseille fortement de respecter les recommandations, présentées à la subdivision 4.2.1, concernant la période de garde des gamètes. On peut toutefois utiliser d'autres périodes et d'autres techniques s'il est démontré qu'elles donnent généralement lieu à des taux de fécondation d'environ 90 % dans les contrôles. Selon certains chercheurs, la semence «sèche» peut être convenablement conservée sur glace pendant de longues périodes, par exemple 8 h chez l'oursin violet de l'Atlantique (Carr et Chapman, 1992), bien qu'on ne les conserve généralement pas plus de 4 h (Chapman, 1992).

On lave les oeufs à trois reprises. On ajoute d'abord 100 mL d'eau de contrôle/de dilution, on mélange, on laisse reposer 10 min, puis on décante. Si on recueille une substance pigmentée en même temps que les oeufs, il est important de rincer ces derniers aussitôt que possible après la collecte, car cette substance peut être toxique pour l'oursin violet du Pacifique et, dans certains cas, pour d'autres espèces. Les oeufs peuvent être conservés dans la dernière eau de contrôle/de dilution, à la température d'essai, pendant 4 h au maximum avant leur utilisation. On recommande d'aérer légèrement les oeufs pendant leur garde.

4.2.2 Préparation de suspensions types de gamètes

Il faut combiner tous les lots de sperme afin d'obtenir une suspension concentrée. Si la semence a été recueillie dans des béchers remplis d'eau, on doit prélever le sperme qui s'est déposé au fond des béchers à l'aide d'une pipette et combiner toutes les semences. La semence devrait être prélevée lentement (pour ne pas provoquer de cavitation) à l'aide d'une pipette dont l'orifice a un diamètre d'au moins 1 mm et déposée dans l'eau en vidant la pipette et en la rinçant à plusieurs reprises avec l'eau dans laquelle on dépose la semence.

La densité du sperme de la suspension initiale est évaluée à l'aide d'un hémocytomètre ou d'un autre appareil de numération cellulaire d'une capacité de grossissement de moins de 400[17]. Pour ce faire, on dilue une petite quantité (0,1 à 1 mL) de la suspension variant de 100 à 10 000 parties (selon la concentration du sperme) d'acide acétique cristallisable à 10 %, préparé avec de l'eau de contrôle/de dilution. Il faut ensuite mélanger en retournant dix fois le récipient, puis attendre que les bulles disparaissent, ce qui prend une ou deux minutes. On place ensuite une goutte du mélange dans la chambre de numération de l'hémocytomètre et on attend 15 min afin que le sperme se dépose. Il faut ensuite compter les spermatozoïdes qui se trouvent dans les 400 petits carrés du milieu. On peut ensuite calculer le nombre de spermatozoïdes présents dans 1 mL de suspension initiale en se servant de l'équation suivante : (facteur de dilution) × (nombre de spermatozoïdes) × (facteur de conversion de l'hémocytomètre) × (facteur de conversion des mm^3 en mL) ÷ (nombre de carrés comptés). Si on utilise un hémocytomètre type (Neubauer), l'équation devient :

N^{bre} de spermatozoïdes/mL = 100 × (n^{bre} de spermatozoïdes) × 4 000 × 1 000 ÷ 400.

Il faut amener la concentration de la suspension initiale de sperme à la concentration désirée pour une suspension spermatique type, en utilisant de l'eau de contrôle/de dilution[18]. La concentration de cette suspension type est déterminée par le rapport spermatozoïdes:oeuf choisi (*cf.* 4.2.3).

---

17 Chapman (1992) fournit des explications détaillées concernant l'hémocytomètre et son utilisation pour la numération spermatique.

18 Il n'existe pas de directives précises quant à la quantité d'eau à utiliser dans la suspension initiale. La technique de prélèvement du sperme déterminera la concentration de la suspension spermatique initiale ainsi que la dilution nécessaire pour obtenir une suspension type. Chaque laboratoire et chaque chercheur créeront des méthodes normalisées de collecte et de dilution qui permettront d'obtenir des concentrations et des dilutions prévisibles et satisfaisantes aux fins de la numération.

Pour la numération spermatique, on peut aussi avoir recours à la turbidité comme indicateur du nombre de spermatozoïdes par mL, sans utiliser l'hémocytomètre. Cette technique présente l'avantage d'accélérer le processus car la mesure de la turbidité ne demande que quelques minutes alors que la numération à l'aide d'un hémocytomètre demande de 20 à 30 min (NCASI, 1992). Elle permet donc de commencer l'essai plus rapidement après la collecte des gamètes. Dans un tube de spectrophotométrie de 1 cm, on mélange la solution concentrée de sperme à de l'eau de contrôle/de dilution juste avant de commencer l'essai. On peut utiliser des turbidimètres types conçus pour l'analyse d'échantillons d'eau. Selon le NCASI (1992), une plage de 2,0 à 4,0 unités de turbidité néphélémétriques (uTN) correspond à la densité spermatique souhaitable. Une densité de 2,5 millions de spermatozoïdes/mL serait associée à 3,0 uTN chez le clypéaster excentrique et à 2,7 uTN chez l'oursin violet du Pacifique. Les mesures de la turbidité offrent une précision presque aussi élevée que la numération. Le NCASI (1992) a établi que le coefficient de variation des résultats de numérations répétées à l'aide d'un hémocytomètre était de 9 % lorsque les dilutions de sperme proviennent d'un seul organisme et de 12 % lorsque les dilutions de 5,0 uTN proviennent de trois mâles. Au moment de publier le présent document, aucun autre laboratoire n'était en mesure de fournir une évaluation de l'analyse turbidimétrique. Le dernier critère permettant de déterminer si l'évaluation turbidimétrique a donné des résultats satisfaisants serait le taux de fécondation du contrôle pendant l'essai; par rapport à un taux optimum de 90 % (*cf.* 4.2.3), il doit être d'au moins 50 % et inférieur à 100 % (*cf.* 4.5.1).

On peut choisir le volume type de 10 mL ou le volume de 5 ou de 2 mL. La concentration de gamètes étant la même dans tous les cas, on ajoute donc au volume choisi la quantité de la suspension de gamètes nécessaire pour atteindre la concentration souhaitée. Dans le volume le plus important (10 mL), par exemple, on ajoute 0,1 mL de la suspension spermatique et 1,0 mL de la suspension d'oeufs. (Voir le tableau 4 qui indique le nombre de gamètes et le volume de la suspension à ajouter aux trois volumes d'essai.)

Les présentes recommandations quant au nombre de gamètes à ajouter aux solutions et aux méthodes à adopter s'appliquent à un essai où on utilise un volume initial de 10 mL. On doit d'abord calculer la concentration souhaitée pour la suspension de sperme. Si on se sert d'un volume de 10 mL, on utilise environ 2 000 oeufs et le rapport sperme:oeufs se situe le plus souvent entre 50:1 et 2 500:1 (cf. 4.2.3), bien qu'il puisse parfois atteindre 20 000:1 ou plus. S'il se situe entre 50:1 et 2 500:1, le nombre de spermatozoïdes nécessaire variera de 100 000 à 5 millions. Puisqu'on ajoute 0,1 mL de la suspension spermatique, la concentration de spermatozoïdes de la suspension type devra normalement se situer entre 1 et 50 millions par mL[19].

---

19 On peut utiliser d'autres volumes de la solution de sperme en modifiant de façon appropriée la concentration de spermatozoïdes de la suspension, mais il est déconseillé d'utiliser des volumes supérieurs à 0,1 mL. Certaines méthodes, par exemple, préconisent l'emploi de 0,5 mL de la solution de sperme, ce qui entraînerait une diminution de la concentration de la substance d'essai de l'ordre de 5 %; ce changement assez considérable doit être pris en considération dans les calculs visant à évaluer l'effet. L'ajout du volume recommandé de 0,1 mL de la suspension spermatique entraîne une variation si faible de la concentration qu'elle est, à toutes fins utiles, négligeable.

Tableau 4 Tableau récapitulatif des quantités de sperme et d'oeufs à ajouter à chaque récipient d'essai pour les trois volumes d'essai

Le nombre de spermatozoïdes apparaissant dans les colonnes 4, 5, et 7 est détérminé par des rapports spermatozoïdes:oeuf de 200:1 et 2 500:1 choisis à titre d'exemples.

Volumes d'essai initial (mL)	N^bre d'oeufs	Volume de la suspension d'oeufs (mL)	N^bre de spermatozoïdes (millions) pour les rapports spermatozoïdes: oeuf courants		Volume de la suspension de sperme ajouté (mL)	Plage de concentration de la suspension de sperme (millions/mL)
			200:1	2 500:1		
10	2 000	1,0	0,4	5	0,1	4 à 50
5	1 000	0,5	0,2	2.5	0,05	4 à 50
2	400	0,2	0,08	1	0,02	4 à 50

On peut facilement déterminer les dilutions à utiliser grâce à l'équation type suivante :

$C1 \times V1 = C2 \times V2$

«concentration 1 × volume 1 = concentration 2 × volume 2».

Si, par exemple, la numération révèle que la concentration de la suspension initiale est de 125 millions de spermatozoïdes/mL et que l'on désire utiliser 5 mL d'une suspension type dont la concentration est de 40 millions/mL, on pourrait calculer comme suit le volume nécessaire (V1) de la suspension initiale qui devra être porté à 5 mL :

$125 \times V1 = 40 \times 5$, donc $V1 = 1{,}6$ mL.

On détermine la densité de la suspension d'oeufs en procédant à une numération; on prépare une solution dont la concentration est de 2 000 oeufs/mL. Pour la numération, on ajoute 1 mL ou moins de la suspension à une cellule de Sedgwick-Rafter et on l'observe sous un grossissement allant de 20 à 100 fois. Il peut être utile de diluer 10 fois, 100 fois et, parfois, 1 000 fois une aliquote pour la numération. L'expérience révèle que l'on peut diluer la suspension initiale, en se fondant sur son aspect, jusqu'à l'obtention d'une concentration de quelques centaines d'oeufs/mL pour ensuite compter le nombre d'oeufs présents dans 0,5 mL. Toute autre technique de numération jugée efficace peut être utilisée. Il est possible d'ajuster la densité de la suspension de façon à atteindre une concentration de 2 000 oeufs/mL en y ajoutant de l'eau de contrôle/de dilution ou, s'il faut augmenter sa densité, en laissant les oeufs sédimenter puis en décantant l'eau de la suspension d'oeufs.

Pour un volume d'essai de 5 mL, on procède exactement de la même façon, mais on ajoute de plus petits volumes de la suspension de gamètes aux récipients d'essai (tableau 4). On pourrait ajouter 0,05 mL de la suspension spermatique (contenant généralement de 2 à 25 millions de spermatozoïdes, selon le rapport spermatozoïdes:oeuf souhaité) et 0,5 mL de la suspension d'oeufs (qui contiendrait 1 000 oeufs).

Pour un essai mené sur un volume initial de 2 mL, on réduit proportionnellement les volumes des suspensions de gamètes. On ajouterait 0,02 mL de la suspension spermatique (contenant généralement de 0,8 à 10 millions de spermatozoïdes) et 0,2 mL de la suspension d'oeufs (contenant environ 400 oeufs).

4.2.3 Rapport spermatozoïdes:oeuf

Chaque laboratoire devrait déterminer par un essai le rapport optimal spermatozoïdes:oeuf, soit celui qui produit un taux de fécondation de 90 % dans la solution de contrôle. Si les taux de fécondation étaient très faibles dans les solutions de contrôle, l'effet d'un produit toxique sur la fécondation serait difficile à distinguer des effets produits par d'autres facteurs environnementaux variables, peu propices à la fécondation. Toutefois, des taux de fécondation trop élevés peuvent indiquer une surconcentration de spermatozoïdes susceptible de masquer, en le compensant partiellement, l'effet du produit toxique, ce qui réduit la sensibilité de l'essai et augmente la CI_{25} ou la CSEO[20]. On dispose de plusieurs méthodes pour établir le rapport spermatozoïdes:oeuf optimal puisque le critère de conformité d'un essai est le taux de fécondation réel dans la solution de contrôle, qu'il soit optimal, c'est-à-dire de 90 %, ou qu'il se situe entre les valeurs extrêmes de 50 et de 100 % (*cf.* 4.5.1)[21].

La documentation indique que, pour les différentes espèces soumises à l'essai, les rapports spermatozoïdes:oeuf qui varient entre 50:1 et 2 500:1 sont ceux qui produisent les taux de fécondation les plus satisfaisants (*cf.* annexe C). Les rapports qui suivent ont permis d'obtenir un taux de fécondation de 70 à 90 % : chez les oursins verts, 2 000:1; chez les oursins violets du Pacifique, généralement 200:1, mais pouvant atteindre 2 000:1; chez le clypéaster excentrique, le plus souvent autour de 1 200:1, mais, selon des sources fiables, des résultats concluants peuvent être obtenus avec une plage de 50:1 à 200:1; et chez les oursins violets de l'Atlantique, 2 500:1. Des directives aussi sommaires ne peuvent toutefois pas garantir l'obtention de résultats satisfaisants par tous les laboratoires et en toute saison. Des essais interlaboratoires canadiens, par exemple, ont montré que dans

---

20 La documentation fait état de certains essais où des taux élevés de fécondation dans les contrôles, attribuables à un rapport spermatozoïdes:oeuf élevé, entraînaient une perte appréciable de sensibilité. Le NCASI (1992) a démontré que, dans sept essais jumelés sur les effluents d'une usine de pâte à papier, les essais les moins sensibles étaient ceux pour lesquels le taux de fécondation dans le contrôle était le plus élevé (cette affirmation repose sur les CI_{50} obtenues pour les gamètes de clypéasters excentriques). Les sept essais pour lesquels le taux de fécondation dans le contrôle se situait en moyenne à 94 % étaient 2,2 fois moins sensibles, en moyenne, que sept essais comparatifs pour lesquels ces taux n'atteignaient en moyenne que 84 %. Dans une autre série de 11 essais réalisés par le NCASI (1992) sur un échantillon d'effluents d'une fabrique de pâte kraft, la moyenne géométrique des CI_{25} de l'effluent se situait à 2,9 % si on utilisait un faible rapport spermatozoïdes: oeuf et passait à 6,7 % pour un rapport spermatozoïdes:oeuf élevé; l'essai utilisant un rapport spermatozoïdes:oeuf élevé était donc de 2,3 fois moins sensible. De la même façon, Dinnel *et al.* (1987) ont montré que la CI_{50} de l'argent chez le clypéaster excentrique était de 23 µg/L lorsqu'on utilisait un faible rapport spermatozoïdes:oeuf, mais de 37 µg/L avec un rapport spermatozoïdes:oeuf élevé, ce qui indique une diminution de la sensibilité de l'ordre de 1,6.

21 La détermination d'un taux cible de fécondation de 90 % contribue à éliminer les risques de sous-concentration ou de surconcentration de spermatozoïdes. Il est possible que d'autres groupes décident d'adopter des essais normalisés préconisant des taux de fécondation dans la solution témoin plus élevés, de 95 % ou plus par exemple. Dans ce cas, l'objectif serait de réduire les variations interlaboratoires, au détriment de la sensibilité. Pour obtenir un taux de fécondation de 90 %, il faut souvent atteindre un équilibre assez précaire entre le rapport spermatozoïdes:oeuf et d'autres facteurs, et chaque laboratoire doit mettre au point des méthodes appropriées.

certains cas, le rapport spermatozoïdes:oeuf devait être 10 fois supérieur aux valeurs mentionnées ci-dessus (Miller *et al.*, 1992).

Idéalement, on devrait établir le rapport approprié immédiatement avant chaque essai, en se servant des gamètes qui seront utilisés dans l'essai en particulier. On peut écourter et simplifier l'analyse préalable en adoptant un ou deux rapports jugés relativement faibles. En se fondant sur les résultats obtenus, on pourrait porter le nombre de gamètes que l'on désire utiliser sur une courbe de fécondation construite à partir des expériences antérieures du laboratoire, ce qui permettrait de choisir un rapport approprié au moment de procéder à l'essai proprement dit.

En pratique, un laboratoire quelconque peut, à partir de son expérience, établir un rapport type qui produise généralement les résultats attendus pour une espèce donnée. Toutefois, l'utilisation systématique d'un rapport type risque de réduire la qualité de l'essai. Ainsi, lorsqu'un rapport type donne un taux de fécondation inférieur à 50 % dans le contrôle ou égal à 100 % dans la solution d'essai (*cf.* 4.5.1), l'essai n'est pas valable et devrait être repris à l'aide d'un autre rapport. D'autres essais peuvent perdre de leur sensibilité s'il y a surconcentration spermatique. Il est possible que le rapport spermatozoïdes:oeuf doive être ajusté en fonction de la saison; on a même signalé des cas où le rapport a dû être décuplé pour cette raison (renseignement obtenu de G.A. Chapman, EPA, Newport, Oregon).

Compte tenu de la variation normale du taux de fécondation des contrôles, on recommande fortement de procéder à une analyse préliminaire (essai préalable sur le contrôle). Les chercheurs qui connaissent bien l'essai sur la fécondation chez les échinides considèrent que l'essai préalable systématique du contrôle leur a permis, à long terme, d'économiser du temps et de l'argent ainsi que de sauvegarder des échantillons parfois irremplaçables. Un laboratoire, notamment, procède invariablement à des essais préalables sur le contrôle en utilisant des lots de gamètes provenant de deux femelles et de deux mâles et au moins trois dilutions du sperme de chaque mâle (Carr et Chapman, 1992).

On peut circonvenir à ces essais en préparant deux ou trois répétitions avec des suspensions présentant des rapports différents pour chaque concentration d'essai, y compris pour le contrôle. On utiliserait alors les résultats obtenus avec les concentrations dont le rapport a produit le taux de fécondation le plus près de 90 % dans le contrôle pour calculer la CSEO/CMEO ou la CI_p (*cf.* sous-section 4.5). Le NCASI (1992) souligne que ce procédé est plus rapide que l'essai préalable sur le contrôle suivi de l'essai comme tel et qu'il présente également l'avantage d'éviter que des changements dans l'activité du sperme ne surviennent entre l'essai préalable et l'essai proprement dit.

En déterminant le rapport spermatozoïdes:oeuf arbitrairement ou par un essai préalable sur le contrôle, on établit également la densité de la suspension spermatique à utiliser (*cf.* 4.2.2). Si, par exemple, pour atteindre un rapport de 2 000:1, on devrait ajouter 2 000 oeufs, le volume de 0,1 mL de suspension spermatique ajouté devrait contenir 4 millions de spermatozoïdes; sa concentration serait donc de 40 millions de spermatozoïdes par mL de suspension.

4.2.4 Exposition des gamètes

Pour l'exposition, on place les récipients dans un support pour tubes à essai ou tout

autre type de support qui sera conservé dans un bain-marie ou dans tout autre appareil à température constante. Les récipients doivent être disposés dans le support de façon tout à fait aléatoire ou de façon aléatoire à l'intérieur de chaque colonne, chacune d'elles contenant une répétition de chaque concentration et du contrôle[22]. Tous les récipients doivent porter une étiquette ou un code correspondant à leur position, qui permettra d'identifier les concentrations et les répétitions.

On devrait vérifier et ajuster à des niveaux acceptables (*cf.* sous-section 4.3), au besoin et selon les exigences, la température, la salinité, la teneur en oxygène dissous et le pH des aliquotes des solutions d'essai avant de les ajouter aux récipients.

Dans le cadre de l'essai, on peut choisir entre trois durées d'exposition qui n'ont par ailleurs aucune incidence sur la méthode d'essai utilisée. Évidemment, on ne peut choisir qu'une seule durée pour un essai donné ou pour des essais comparatifs. L'exposition la plus courte sert normalement aux essais types et de contrôle. On expose le sperme 10 min, on ajoute les oeufs et on l'expose de nouveau pendant 10 min. Il s'agit de l'essai de 20 min.

On peut avoir recours à l'une ou l'autre des deux périodes d'exposition plus longues pour répondre à des exigences particulières, dans le cadre d'une recherche, par exemple, ou lorsque l'on désire comparer les résultats à ceux d'autres travaux. On peut donc utiliser une exposition du sperme de 20 min suivie d'une exposition du sperme et des oeufs de même durée; il s'agit de l'essai de 40 min. L'exposition la plus longue comporte une période d'exposition du sperme de 60 min suivie d'une exposition du sperme et des oeufs de 20 min; il s'agit de l'essai de 80 min[23].

---

22 On peut déterminer la répartition aléatoire de différentes façons et la plupart des laboratoires utilisent des méthodes qui leur sont propres. Certains laboratoires disposent de programmes informatiques conçus pour répondre aux exigences de l'essai sur les échinides, qui font appel à la génération de nombres aléatoires. On pourrait, pour assurer l'objectivité et la validité des tests statistiques, faire un essai à l'insu en demandant à une personne autre que celle qui comptera les oeufs fécondés d'identifier par codes tous les récipients, y compris ceux contenant les contrôles et les produits toxiques de référence.

23 On considère généralement que la période d'exposition la plus longue augmente la sensibilité de l'essai de toxicité. Toutefois, l'évaluation de l'effet toxique n'est pas tellement plus précise, car il se produit généralement une chute du taux de fécondation dans le contrôle attribuable à la période prolongée de conservation du sperme avant l'ajout des oeufs. Le taux de fécondation peut passer de 90 % pour une exposition du sperme de 10 min, à 30 % pour une exposition de 60 min (Pagano *et al.*, 1983). Il se peut que la différence apparente entre les résultats obtenus avec le contrôle et les concentrations d'essai n'augmente pas de façon sensible avec une exposition prolongée du sperme [essai sur le cadmium (Pagano *et al.*, 1986)]. Lors d'un essai sur le clypéaster excentrique, des chercheurs de la Colombie-Britannique ont pu observer cette diminution du taux de fécondation dans le contrôle après des périodes d'exposition du sperme de 10 et de 30 min (renseignement obtenu de G.C. van Aggelen, ministère de l'Environnement de la Colombie-Britannique).

Les chercheurs canadiens participant à un essai comparatif interlaboratoire ont privilégié la plus courte période d'exposition (10 min + 10 min) (Miller *et al.*, 1992). La perte de sensibilité de l'essai court est peut-être compensée par une variabilité moins marquée des résultats. Lors de sept essais comparatifs portant sur la toxicité des effluents des usines de pâte de papier blanchie sur le clypéaster excentrique, l'essai court (durée totale de 20 min) était moins sensible par un facteur de 2,4 que l'essai long (durée totale de 80 min), mais le coefficient de variation de l'essai de courte durée était deux fois moins élevé (NCASI, 1992).

La durée d'exposition est indépendante du volume choisi à partir des trois possibilités (on dispose donc de neuf combinaisons possibles pour l'essai). On utilise généralement un volume d'essai de 10 mL; c'est l'option qui a été retenue dans le présent document[24]. On procède exactement de la même manière avec des volumes de solution d'essai de 5 et de 2 mL, mais on devrait réduire proportionnellement les volumes des suspensions de gamètes (*cf.* tableau 4).

On mélange d'abord la solution de sperme et, au début de chaque essai, on ajoute 0,1 mL de cette solution à tous les récipients qui contiennent déjà 10 mL de la solution d'essai (*cf.* 4.1.2). À la fin de la période d'exposition du sperme, on agite la préparation d'oeufs et on en ajoute 1,0 mL à tous les récipients. Il faut utiliser des micropipettes à distribution automatique afin de respecter les courts délais nécessaires à l'exécution de ces tâches. Il faut faire très attention lorsqu'on ajoute le sperme et les oeufs dans les récipients et on doit déverser directement dans la solution d'essai tout le liquide libéré par la pipette en veillant à ce qu'il ne touche pas les parois du récipient; de plus, l'extrémité de la pipette ne doit pas entrer en contact avec la solution d'essai. On devrait agiter les suspensions de gamètes après avoir rempli deux ou trois récipients. Une fois le sperme ajouté à toutes les solutions, puis une fois les oeufs mis en place, on devrait bien mélanger les solutions, soit en remuant les récipients, en prélevant et libérant du liquide avec la pipette, soit en les agitant brièvement à l'aide d'un vortex.

On devrait établir à quel intervalle le sperme sera ajouté à chaque récipient (p. ex., toutes les cinq secondes). On devrait ajouter les oeufs aux récipients dans le même ordre et suivant le même intervalle que le sperme de façon à uniformiser le temps d'exposition. De la même manière, on devrait mettre fin à l'essai en respectant le même ordre et le même intervalle. On ne devrait pas ajouter les gamètes en fonction de leur concentration mais plutôt par groupe de répétitions, c'est-à-dire en commençant par le premier groupe de répétitions et ainsi de suite (Chapman, 1992).

Lorsque la période d'exposition du sperme et des oeufs est écoulée, on met fin à l'essai en ajoutant à chaque récipient soit 2 mL de glutaraldéhyde à 1 %, soit 2 mL de formol tamponné à 10 %[25]. (On divise la quantité d'agent de conservation par deux ou par cinq si on utilise les petits volumes.) On devrait compter les oeufs conservés au plus tard trois jours après la fin des essai. Lors du stockage, les récipients devraient toujours être scellés (p. ex., au moyen d'une pellicule de plastique).

4.3 Conditions de l'essai

Il s'agit d'un essai statique, sans renouvellement des solutions d'essai. La température d'essai est de 15 °C pour les

---

24 Des chercheurs canadiens participant à une étude comparative interlaboratoire ont privilégié le volume de 10 mL et l'ont adopté comme méthode d'essai normalisée (Miller *et al.*, 1992). Ceux-ci craignaient qu'un volume plus faible réduise la précision des manipulations de liquides et accentue l'effet de bord aux endroits où l'échantillon est en contact avec l'air et avec les récipients d'essai.

25 Le formol est une solution de formaldéhyde de 37 à 40 %. Pour préparer du formol tamponné à 10 %, il faut ajouter 100 mL de formol, 4 g de diphosphate de sodium et 6,5 g de phosphate disodique anhydreux à 900 mL d'eau distillée. Le formol est une substance dangereuse, à manipuler sous une hotte; on doit également compter les oeufs dans un endroit ventilé. La manipulation du glutaraldéhyde doit également se faire sous la hotte ou dans un endroit bien aéré. Les deux substances doivent être gardées à l'écart des zones où les organismes sont conservés et mis à l'essai. Certains chercheurs ajoutent une solution d'eau de javel immédiatement avant la numération des oeufs afin de neutraliser l'excès de formol.

quatre espèces indigènes et de 20 °C pour les espèces non indigènes mentionnées. Dans tous les récipients, la salinité est normalement à 1 g/kg près de la solution de contrôle, dans l'échelle de 28 à 34 g/kg. Il faut chercher, s'il y a lieu, à élever le niveau d'oxygène dissous de toutes les solutions d'essai au-dessus de 40 % de saturation.

4.3.1 Température

La température d'essai devrait être de 15 °C pour les oursins verts, les oursins violets du Pacifique et les clypéasters excentriques. Elle devrait être de 20 °C pour les espèces non indigènes que sont les oursins violets de l'Atlantique et les oursins blancs. La température de toutes les solutions d'essai ne devrait pas s'écarter de plus de 1 °C de la valeur visée et déterminée par les mesures des aliquotes ou des récipients sans gamètes (réservés pour la surveillance de la température). On devrait vérifier la température au début de l'essai et à des moments représentatifs pendant l'essai.

Les températures d'essai recommandées sont supérieures de 3 à 6 °C aux valeurs recommandées pour la garde des adultes des mêmes espèces, mais elles demeurent dans l'échelle biocinétique. Ces températures plus élevées devraient favoriser l'identification de certaines substances toxiques[26].

Certaines des températures recommandées sont conformes à celles antérieurement utilisées dans les méthodes au Canada ou dans les méthodes normalisées aux États-Unis. Cependant, elles sont inévitablement différentes des températures utilisées ailleurs, étant donné la profusion des méthodes (*cf.* annexe C).

4.3.2 Salinité

La salinité devrait être de 30 g/kg dans un essai classique. Toutes les solutions d'essai devraient présenter une salinité de 28 à 34 g/kg, l'écart par rapport à la salinité de la solution de contrôle n'étant pas supérieur à 1g/kg[27].

---

26 Dans les analyses de fécondation à salinité favorable de 28 g/kg, la CI_{50} pour l'argent diminuait fortement lorsque les températures passaient de 7 à 12 et à 17 °C. Dans le cas des oursins verts, la CI_{50} était respectivement de 215, 110 et 38 µg/L, tandis qu'elle était respectivement de 120, 88 et 66 µg/L pour les clypéasters excentriques (Dinnel *et al.*, 1982). La température d'essai ne semble pas avoir influé de la manière prévue sur la CI_{50} pour l'insecticide endosulfan.

27 On considère que la plage de tolérance à la salinité est relativement étroite pour les gamètes et les larves des échinides. Par conséquent, une faible salinité peut fortement influer sur les mesures de toxicité d'une analyse de fécondation. Dans le cas des oursins violets du Pacifique, par exemple, le taux de fécondation a diminué lorsque la salinité passait de 30 à 28 g/kg et ce, en l'absence de toute substance toxique (Oshida *et al.*, 1981). Des travaux ultérieurs ont montré que le taux de fécondation pour ces oursins ne commençait à diminuer que lorsque la salinité tombait sous le seuil de 20 g/kg (Dinnel *et al.*, 1987). Toutefois, ce dernier résultat peut s'expliquer par un rapport spermatozoïdes:oeuf élevé, susceptible de compenser l'effet d'une faible salinité. Pour ce qui est des oursins verts, le taux de fécondation a baissé lorsque la salinité était de 24 g/kg et moins (Dinnel *et al.*, 1987). Une faible salinité peut s'accompagner d'une augmentation de la vulnérabilité aux substances toxiques (ASTM, 1990). Par exemple, pour des oursins verts soumis à des essais à une température de 10 °C, on a constaté une CI_{50} pour l'argent de 94, 45 et 34 µg/L lorsque la salinité s'établissait respectivement à 30, 28 et 26 g/kg. On a cependant peu ou pas de changement de la CI_{50} pour l'insecticide endosulfan (Dinnel *et al.*, 1987). La faible salinité a influé tout particulièrement sur l'augmentation de la toxicité de l'argent, dans l'analyse de fécondation des oursins verts, lorsque l'essai était réalisé à haute température (17 °C) ou à basse température (7 °C), la salinité ayant peu d'effet lorsque la température était quasi-optimale, c'est-à-dire à 12 °C (Dinnel *et al.*, 1982). Dans un autre essai portant sur des oursins d'Afrique du Sud (du genre *Parechinus*), on a constaté que le taux de fécondation chutait parallèlement à la diminution de la salinité par rapport à l'eau de mer normale. La fécondation était optimale lorsque la salinité se situait entre 28 et 37 g/kg, et les oeufs ont montré une plus grande vulnérabilité que les spermatozoïdes (Greenwood et Bennett, 1981).

Lorsque l'essai porte sur un produit chimique, on devrait amener ce produit aux concentrations d'essai avec de l'eau de contrôle/de dilution (*cf.* 4.1.1) dont la salinité sera dans l'échelle requise. La salinité des échantillons aqueux (p. ex., les effluents) devrait être mesurée avant l'essai et, s'il y a lieu, ajustée avec de la saumure, des sels marins ou de l'eau douce désionisée ou propre, selon les besoins (*cf.* 2.3.4).

Les échantillons d'effluent, de lixiviat, de milieu récepteur et d'élutriat ou tout autre extrait aqueux de sédiment pourraient également être soumis à l'essai sans ajustement de la salinité de l'échantillon lorsque l'objet de l'étude consiste à évaluer l'effet total, y compris les écarts de salinité. Lorsque, par sa salinité, un échantillon se rapproche de l'eau douce (salinité inférieure à 5g/kg) ou d'une saumure, les résultats de l'essai de toxicité indiqueront probablement une salinité peu propice à la fécondation plutôt que la présence de substances toxiques dans l'échantillon. Lorsque l'essai porte sur un échantillon à salinité non ajustée, il serait conseillé d'éprouver une série de solutions de contrôle de la salinité, au moyen de concentrations parallèles d'eau distillée (*cf.* 4.1.4), de réaliser un deuxième essai avec un échantillon dont la salinité est ajustée ou d'employer ces deux méthodes, pour évaluer la contribution de la salinité à la toxicité.

4.3.3 Oxygène dissous et aération

On ne devrait aérer l'échantillon ou une aliquote de l'échantillon avant d'effectuer l'essai (préaération) que si la teneur mesurée en oxygène dissous de l'échantillon est inférieure à 40 % ou supérieure à 100 % de saturation. L'aération devrait se faire à l'aide d'air comprimé exempt d'huile et d'une pipette jetable en verre. La taille des bulles devrait être de 1 à 3 mm et le débit devrait être minimal, tout en favorisant l'aération efficace du récipient et du volume de liquide à soumettre à l'essai. La durée de la préaération devrait être limitée au moindre de 20 min ou du temps requis pour obtenir 40 % de saturation (ou 100 %, dans un cas de sursaturation)[28]. On devrait interrompre la préaération au bout de 20 min, pour immédiatement effectuer l'essai, quel que soit le pourcentage de saturation de l'aliquote ou de toutes les solutions d'essai. Il faut consigner, au début de l'essai, l'information sur l'oxygène dissous dans les aliquotes représentatives des solutions d'essai, y compris la concentration maximale. Toute préaération doit figurer dans le procès-verbal de l'essai (*cf.* section 9).

Lorsque le niveau d'oxygène dans un ou plusieurs récipients est inférieur à 40 % de saturation, l'essai n'est pas valable aux fins de l'évaluation toxicologique, en soi, de la substance à expérimenter. L'essai demeurerait cependant valable aux fins de l'évaluation de l'effet total de la substance

---

28 L'aération peut éliminer les produits chimiques volatils de la solution ou accroître leur taux d'oxydation et de décomposition en d'autres substances. Cependant, l'aération d'un échantillon avant l'exposition des gamètes pourrait s'imposer en raison de la demande d'oxygène de la substance à éprouver (p. ex., en cas de diminution de la teneur en oxygène pendant le stockage de l'échantillon). Dans une analyse de fécondation, étant donné les faibles volumes des solutions d'essai, l'aération des concentrations individuelles n'est pas pratique et on procède à l'aération d'une aliquote de l'échantillon seulement lorsque la situation l'exige.

(p. ex., un effluent), y compris la désoxygénation[29]. Dans la plupart des cas, l'utilisation requise d'une eau de contrôle/de dilution saturée en oxygène donnera lieu à des niveaux d'oxygène dissous qui ne devraient pas influer considérablement sur les résultats de l'essai.

4.3.4 pH

On doit mesurer le pH dans les aliquotes de la ou des solutions de contrôle, aux concentrations supérieure, moyenne et inférieure, avant d'effectuer l'essai.

On devrait normalement effectuer les essais de toxicité à des fins de surveillance ou de conformité, sans ajustement du pH[30]. Cependant, lorsque l'échantillon de la substance à éprouver fait passer le pH de l'une ou l'autre des solutions d'essai à moins de 7,5 ou à plus de 8,5, les résultats obtenus pourraient correspondre aux seuls effets imputables au pH[31]. Lorsque l'objet de l'étude consiste à évaluer les produits chimiques en soi, plutôt que les effets nocifs ou modificateurs du pH, on devrait ajuster le pH des solutions ou de l'échantillon ou, encore, effectuer parallèlement un deuxième essai à pH ajusté. Dans ce dernier cas et selon l'objet de l'étude, on peut ajuster le pH initial de l'échantillon ou de chaque solution d'essai jusqu'à l'obtention d'une valeur équivalant à ± 0,5 le pH de l'eau de contrôle/de dilution, avant l'exposition des gamètes. Une autre approche acceptable d'ajustement consiste à modifier chaque solution d'essai, y compris la solution de contrôle, à la hausse jusqu'à ce que le pH se situe entre 7,5 et 8,0 (pour une solution dont le pH est inférieur à 7,5) ou à la baisse jusqu'à ce que le pH atteigne 8,0 à 8,5 (pour une solution dont le pH est supérieur à 8,5). Pour tout ajustement du pH, on devrait normalement utiliser des solutions d'acide chlorhydrique (HCl) ou d'hydroxyde de sodium (NaOH) de titre ≤ 1 *N*. Dans certains cas (p. ex., lorsqu'il s'agit d'échantillons d'effluents dont le pH est

---

29 La limite inférieure de 40 % de saturation pour l'oxygène dissous est un chiffre arbitraire, parce que des niveaux d'oxygène nettement supérieurs ont un effet de stress sur la plupart des organismes aquatiques et qu'ils affectent probablement les gamètes de ces organismes. Le stress qu'exerce un faible niveau d'oxygène peut interagir avec le stress engendré par les substances toxiques et être pris en considération dans la mesure de l'effet de l'échantillon, qu'il s'agisse d'un effluent ou de toute autre substance à éprouver. Lorsque l'OD est supérieur à 40 % de saturation, toute interaction est, dans les présentes méthodes d'essai, admise comme faisant partie intégrante de l'effet évalué.

30 Le fait de ne pas corriger le pH de l'échantillon ou des solutions d'essai s'explique par la forte influence que peut avoir le pH sur la toxicité de la substance à éprouver. Par conséquent, toute modification du pH du milieu récepteur et toute modification concomitante de la toxicité pourraient être acceptées comme faisant partie intégrante de la pollution. On en arrive à l'analyse raisonnée selon laquelle le pH ne devrait pas être corrigé au cours des essais.

31 On sait que le pH influe sur la reproduction des oursins verts (Starr, 1990). Les essais réalisés avec des oursins d'Europe ont montré que la viabilité des spermatozoïdes était prolongée lorsque le pH se situait entre 6 et 7,5, comparativement à un pH de 8,0. Cependant, les spermatozoïdes subissent des dommages évidents lorsque le pH est inférieur à 8,0, étant donné l'augmentation du nombre d'anomalies de développement pour un pH de 7,5 et du nombre d'anomalies mitotiques pour un pH de 7,0 (Pagano *et al.*, 1985).

fortement tamponné), on devra recourir à des titres supérieurs d'acide ou de base[32].

Il se peut que le chercheur veuille réaliser l'essai le plus sensible possible pour identifier les produits chimiques toxiques plutôt que d'inclure le pH dans l'effet total d'un produit chimique, d'un effluent, d'un lixiviat ou d'un élutriat. Il faudrait alors éliminer tout effet associé à un pH faible ou élevé sur la viabilité des gamètes et sur le taux de fécondation, en ajustant le pH des solutions d'essai, s'il y a lieu, pour qu'il soit dans l'échelle privilégiée de 8,0 à 8,2[33].

Abernethy et Westlake (1989) proposent des lignes directrices utiles pour l'ajustement du pH. On devrait laisser s'équilibrer, après chaque addition d'acide ou de base, les aliquotes des échantillons ou les solutions d'essai faisant l'objet d'un ajustement du pH[34]. Le temps requis pour l'équilibration déprendra du pouvoir tampon de la solution ou de l'échantillon. Pour les échantillons d'effluents, un délai de 30 à 60 min est recommandé entre chaque ajustement du pH (Abernethy et Westlake, 1989). Dans un essai portant sur des échinides, on ajusterait le pH des aliquotes utilisées pour préparer les concentrations d'essais, on consignerait le pH de chaque aliquote (*cf.* sous-section 4.4) et on effectuerait l'essai sans faire d'autres ajustements.

Lorsque l'essai de toxicité vise à mieux comprendre les caractéristiques des substances toxiques présentes dans l'échantillon, l'ajustement du pH est souvent employé parmi d'autres techniques (p. ex., l'oxydation, la filtration, l'extraction à l'air, l'ajout d'un agent chélatant), pour caractériser et préciser la toxicité de l'échantillon. Ces techniques d'évaluation de l'identification de la toxicité (EIT) sont utiles pour déterminer les caractéristiques physico-chimiques des substances toxiques, ainsi que la mesure dans laquelle celles-ci peuvent être détoxiquées (EPA, 1991a; 1991b).

---

32 L'analyse raisonnée prônant l'ajustement du pH ne s'oppose pas vraiment aux raisons précédemment mentionnées de ne pas ajuster le pH des eaux résiduaires. C'est l'objet de l'essai qui est le facteur déterminant. Certains produits chimiques et certaines eaux résiduaires entraînent des niveaux de pH ayant des effets létaux ou sublétaux directs, surtout dans les essais de surveillance ou de conformité portant sur des effluents non dilués. Il est peu probable qu'un analyste cherche essentiellement à déterminer la toxicité d'un pH extrême, étant donné que ce pH ne serait pas représentatif des conditions qui prévaudront vraisemblablement dans l'eau de mer réceptrice naturellement tamponnée, même après une dilution modérée. Si le pH en soi présentait un intérêt prépondérant, on procéderait à des mesures physico-chimiques, par souci d'économie. Dans bien des cas, un analyste voudra déterminer la présence de substances toxiques dans une eau résiduaire et devra donc éliminer tout masquage dû à une action toxique du pH. Pour ce faire, il devra utiliser des échantillons ou des solutions d'essai au pH corrigé, en plus de normaliser la température, la salinité et l'oxygène dissous en fonction de valeurs favorables aux essais de toxicité.

33 Parmi les six documents d'application connus qui indiquent des exigences de pH pour l'analyse de fécondation cinq préconisent un pH de 7,8 à 8,2 (*cf.* annexe C).

34 Pour les essais portant sur un produit chimique, un effluent, un lixiviat, un élutriat ou un extrait aqueux de sédiment qui fera l'objet d'un ajustement du pH, il faudra peut-être ajuster séparément chaque solution d'essai, y compris la solution de contrôle. Pour les essais portant sur un milieu récepteur, on ajusterait normalement le pH d'une aliquote de l'échantillon non dilué, avant de préparer les concentrations d'essai.

4.4 *Observations et mesures*

Au terme de l'exposition, on prélève, après mélange[35], des oeufs intacts dans chaque récipient; on dénombre une quantité égale d'oeufs (entre 100 et 200) provenant de chaque récipient, puis on classe les oeufs selon qu'ils sont fécondés ou non (*cf.* figure 3). Le dénombrement s'effectue au moyen d'un microscope grossissant (grossissement de 100 fois). Les microscopes à contraste de phase sont particulièrement recommandés. Une cellule à numération, comme une cellule de Sedgwick-Rafter, pourrait être utile, bien que le dénombrement puisse être réalisé à l'aide d'une boîte de Petri gravée. La technique utilisée est importante et peut influer sur l'exactitude du dénombrement. La constance de l'opération devrait faire l'objet d'une vérification, surtout lorsque plusieurs personnes se partagent la tâche du dénombrement des oeufs.

Le critère de fécondation est le soulèvement de la membrane de fécondation. La membrane peut être entièrement soulevée, partiellement soulevée ou affaissée (*cf.* figure 3), trois caractéristiques que n'ont pas les oeufs non fécondés (NCASI, 1991)[36].

Des phénomènes comme l'affaissement partiel de la membrane ou le déplacement de l'oeuf vers une paroi de la sphère hyaline peuvent survenir pendant la période de conservation qui suit l'essai. Aux fins du dénombrement, on néglige les oeufs manifestement anormaux ainsi que les oeufs morts, qu'ils soient fécondés ou non. On consigne les résultats du dénombrement pour chaque récipient.

4.5 *Résultats et calculs*

Le résultat biologique de l'essai est l'inhibition de la fécondation, évaluée par rapport aux échantillons de contrôle. On détermine le taux de fécondation pour chaque récipient d'essai.

Le taux de fécondation permet de calculer différents résultats statistiques. L'analyse raisonnée et les méthodes de calcul sont énoncées ci-après et décrites en détail dans le document de l'EPA de 1988. On peut déterminer statistiquement la *CSEO* et la *CMEO* par vérification des hypothèses, technique hautement recommandée. On conseille aussi de déterminer la *concentration inhibitrice pour un pourcentage donné* (CI_p). Pour l'analyse des résultats, il vaudrait mieux profiter des conseils d'un statisticien.

4.5.1 *Validité de l'essai*

L'essai n'est pas valable lorsque le taux de fécondation dans l'eau de contrôle est inférieur à 50 % ou lorsque la fécondation

---

35 La plupart des oeufs se trouvent habituellement dans la partie inférieure du récipient et peuvent y être prélevés. Cependant, les oeufs non fécondés forment parfois des amas qui collent aux parois de verre. Le prélèvement excédentaire ou déficitaire de ces oeufs pourrait fausser les résultats. Comme mesure correctrice, on peut enlever une bonne partie de la solution sus-jacente, avec une pipette, pour ensuite mélanger les oeufs en plus forte concentration avant de les prélever.

36 Un pH faible ou élevé ou une haute température peuvent produire de fausses membranes de fécondation. Lorsque ces facteurs semblent avoir une incidence sur un échantillon d'essai, on peut préparer un ou plusieurs récipients distincts à forte concentration et sans conservation, pour vérifier le lendemain l'évolution normale des oeufs à l'état larvaire. On peut également inclure, dans le cadre de l'essai, une solution de l'essai à blanc (c.-à-d. des récipients contenant une solution d'essai à laquelle on ajoute des oeufs non fécondés et absents de sperme) afin de déceler les fausses membranes de fécondation.

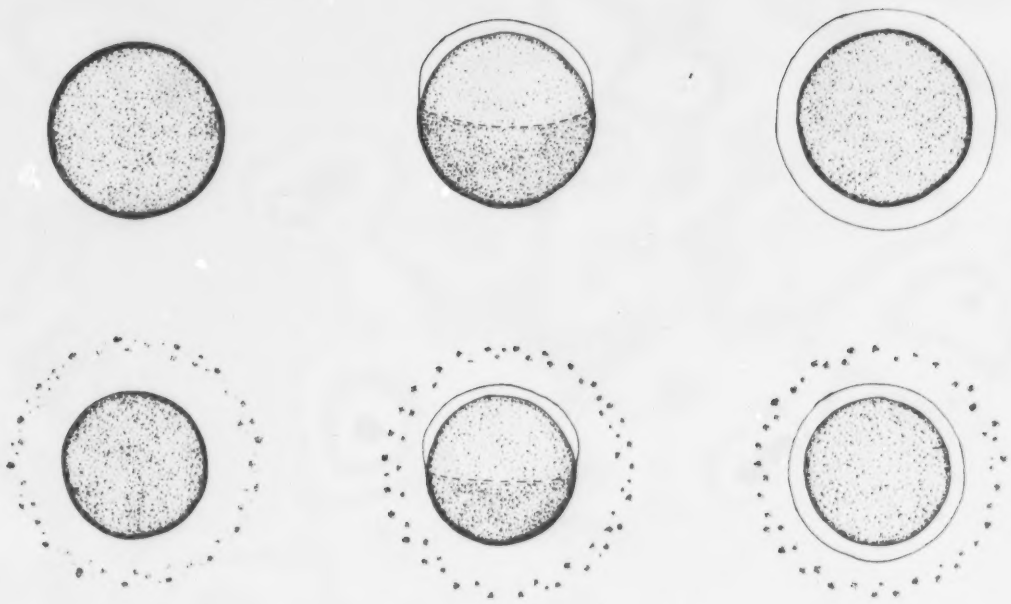


Figure 3 **Caractéristiques distinctives des oeufs fécondés et non fécondés**
Les dessins représentent des oeufs, comme on les voit au moyen d'un microscope à dissection. Les trois dessins du haut sont des oeufs d'oursin, tel l'oursin vert. L'oeuf de gauche n'est pas fécondé. L'oeuf du milieu montre une membrane de fécondation partiellement soulevée et est considéré fécondé. L'oeuf de droite montre une membrane de fécondation entièrement soulevée. Les oeufs de l'oursin violet du Pacifique sont comparables, sauf qu'une membrane hyaline peut être visible entre l'oeuf et la membrane de fécondation. Les trois dessins du bas sont des oeufs de clypéaster excentrique. De gauche à droite, les oeufs sont non fécondé, fécondé avec membrane partiellement soulevée et fécondé avec membrane entièrement soulevée. La pellicule gélatineuse des oeufs du clypéaster renferme des granules pigmentaires et disparaît habituellement pendant les phases ultérieures de développement des oeufs. Les dessins ont été réalisés par M. A. White à partir des lames préparées par McGibbon et Moldan (1986) et des dessins de Kelley Battan, NCASI, Anacortes, Washington.

est complète (c.-à-d. si l'on obtient un taux de 100 % dans toutes les répétitions de la solution de contrôle)[37]. Pour que les résultats soient considérés valables, il faut obtenir une courbe dose-effet réelle et logique. En règle générale, l'effet sur la fécondation doit être plus prononcé lorsque la concentration est plus forte. De plus, l'essai doit satisfaire aux exigences physiques et chimiques requises.

Lorsque le niveau d'oxygène dissous est inférieur à 40 % de saturation dans un ou plusieurs récipients, l'essai ne devrait pas être considéré comme une mesure valable de la nature toxique en soi de la substance analysée. L'essai demeurerait néanmoins une mesure valable de l'effet total de cette substance (*cf.* 4.3.3).

4.5.2 Concentration sans effet observé

On détermine la CSEO et la CMEO en fonction des taux de fécondation de chaque sous-échantillon du témoin des différentes concentrations. Lorsque la fécondation est nulle dans tous les sous-échantillons d'une concentration donnée, cette concentration est exclue des calculs visant à déterminer la CSEO/CMEO.

Le programme TOXSTAT[38] précise les méthodes statistiques à observer (Gulley *et al.*, 1989). On peut obtenir une version à jour du programme TOXSTAT sur disquette (*cf.* annexe B). Les méthodes du programme TOXSTAT commencent par une vérification de la normalité et de l'homogénéité de la variance et prévoient des tests applicables à différentes formes de répartition.

Lorsque les données sont symétriques ou peuvent le devenir en subissant une transformation appropriée, on procède à une analyse de variance. Le test de Dunnett, qui est un test classique de comparaisons multiples, permet de mesurer les écarts entre chaque concentration et le témoin. Le test de Dunnett fournit des mesures estimatives de la différence significative minimale (DSM), soit la grandeur de l'écart inévitable du taux de fécondation moyen entre le témoin et une concentration à expérimenter, avant qu'on puisse conclure à un effet statistiquement significatif pour cette concentration. Le test de Dunnett n'est pas un outil particulièrement efficace pour distinguer les différents effets dans les essais de toxicité étant donné qu'il néglige l'information sur le classement par grandeur des concentrations analysées (Masters *et al.*, 1991). Le programme TOXSTAT propose également le test de Williams, lequel est sensible à la relation entre le degré d'effet et le classement par grandeur des concentrations (Gulley *et al.*, 1989). Le test de Williams (Williams, 1971; 1972) est recommandé comme solution de rechange au test de Dunnett. Lorsque le nombre de sous-échantillons est inégal du fait d'une perte accidentelle ou pour toute autre raison,

---

37 Bien que l'objectif de l'essai soit d'obtenir un taux de fécondation de 90 %, un résultat satisfaisant par rapport au témoin, le seuil inférieur de validité a été établi à ≥ 50 % du témoin, étant donné qu'un tel essai peut fournir des renseignements utiles. Le seuil supérieur de validité est établi à *moins de 100 %*, étant donné que des taux élevés de fécondation indiquent une quantité excessive de spermatozoïdes et sont associés à une perte de sensibilité de l'essai.

38 Les méthodes proposées dans le programme TOXSTAT ne sont pas décrites dans le présent document, parce qu'il vaut mieux observer les directives écrites, jointes au programme sur disquette. On peut brièvement souligner que les données sont soumises au test *Shapiro-Wilks* de normalité et au test de *Bartlett* d'homogénéité. Lorsque les données ne satisfont pas aux exigences, il est possible de les transformer en conséquence au moyen de logarithmes ou de la fonction arc sinus. La transformation peut diminuer la sensibilité de l'analyse et la capacité des essais à déceler les écarts.

on remplace les tests de Dunnett ou de Williams par le *test T de Bonferroni*.

Pour un ensemble de données qui ne peut satisfaire aux exigences de normalité ou d'homogénéité et qui ne peut être transformé en conséquence, le programme TOXSTAT prévoit des tests non paramétriques (*test de Steel* ou *test de Wilcoxon*, lorsque le nombre de sous-échantillons est inégal). On peut avoir recours à ces tests non paramétriques, qui sont des outils utiles lorsque les données ne sont pas normalement réparties. Dans le cas contraire, cependant, les tests non paramétriques sont moins efficaces que les tests paramétriques et pourraient ne pas réussir à identifier les écarts réels d'effet, entraînant éventuellement une sous-estimation de la toxicité. Pour utiliser les tests non paramétriques, quatre répétitions sont requises.

On calcule souvent la moyenne géométrique de la CSEO et de la CMEO pour remplacer deux chiffres par un seul. On peut utiliser et consigner cette valeur, en tenant compte cependant qu'il s'agit d'une mesure arbitraire de l'effet de seuil de toxicité, pouvant se situer n'importe où dans l'échelle, entre la CSEO et la CMEO. La valeur de la moyenne géométrique dépend des concentrations choisies par le chercheur pour réaliser l'essai. On ne peut établir statistiquement l'intervalle de confiance de la CSEO et de la CMEO. C'est également le cas pour leur moyenne géométrique, bien que la CSEO et la CMEO indiquent les limites extrêmes de l'estimation. Aux États-Unis, on dit souvent de la moyenne géométrique de la CSEO et de la CMEO qu'elle est la *valeur chronique*. On l'appelle aussi parfois la *valeur subchronique*. Il s'agit là d'expressions trompeuses pour l'essai en question étant donné que les gamètes représentent une fraction extrêmement petite de la durée de vie des échinides et que l'exposition chronique ne peut s'appliquer dans leur cas. On recommande de désigner cette moyenne géométrique par le sigle ***CSE***, qui signifie *concentration seuil d'effet*. L'emploi de «seuil» dans cette expression correspond à la limite à laquelle un phénomène provoque un effet donné.

4.5.3 Concentration inhibitrice

Comme solution de rechange ou pour obtenir un résultat supplémentaire, on a de plus en plus recours au calcul de la CI_p (concentration inhibitrice pour un pourcentage d'effet donné), soit l'estimation ponctuelle de la concentration provoquant un certain degré d'effet. Le pourcentage est choisi par le chercheur et correspond habituellement à une diminution de 20 ou 25 % du taux de performance par rapport à la concentration de contrôle[39]. Pour l'essai à l'étude, on recommande la CI_{25}, soit la concentration réputée provoquer une diminution de 25 % du taux de fécondation par rapport à la concentration de contrôle.

Comparativement aux mesures de la CSEO/CMEO, on considère souvent que la CI_p est une mesure plus utile et plus souhaitable de l'effet étant donné qu'elle permet d'établir l'intervalle de confiance et de procéder à des comparaisons statistiques avec les CI_p obtenues dans d'autres essais (Suter *et al.*, 1987). On ne peut établir ces comparaisons d'une manière aussi logique ou encore avec des tests axés sur les différences significatives, au moyen de l'approche de vérification des hypothèses employée pour la CSEO/CMEO.

---

39 Dans certains documents consacrés à d'autres essais de sublétalité, on signale que la CI_{25} ou la CI_{20} est une mesure utile de l'effet sublétal, comparable en grandeur à la CMEO.

L'information sur le taux de fécondation pour chaque concentration permet d'établir l'inhibition de la fécondation et de l'exprimer en pourcentage de diminution par rapport au témoin. Pour une concentration donnée, le *pourcentage de diminution de la fécondation* (PDF) se calcule au moyen de la formule suivante :

$$PDF = \frac{TFC - TFO}{TFC}$$

où PDF = pourcentage de diminution de la fécondation;

TFD = taux de fécondation observé dans un récipient donné;

TFC = taux de fécondation de contrôle dans l'eau de dilution/de contrôle[40].

Une analyse du pourcentage de diminution de la fécondation, en vue de déterminer la CI_p, devrait débuter par une mise en graphique sommaire des valeurs PDF en fonction du logarithme de la concentration d'essai. La lecture de la CI_{25} (ou de toute autre CI_p) se ferait à partir d'une droite d'ajustement. Cette représentation approximative permettrait de s'assurer que les résultats des calculs mathématiques sont raisonnables. Le graphique permettrait aussi de confirmer la relation positive et logique entre la concentration et l'effet, laquelle est une exigence aux fins de la validation de l'essai (*cf.* 4.5.1).

On peut réaliser une estimation mathématique de la CI_p au moyen d'une méthode directe d'*interpolation linéaire* (*cf.* annexe J, EPA, 1989). On peut établir, sur ordinateur, l'intervalle de confiance pour la CI_p au moyen d'un procédé informatique d'amorce (programme BOOTSTRP) qui intègre l'interpolation linéaire à l'estimation de la CI_p proprement dite (Norberg-King, 1988; EPA, 1989). On peut obtenir le programme BOOTSTRP sur une disquette, fournie par l'utilisateur, en s'adressant à un bureau régional d'Environnement Canada (*cf.* annexe B)[41]. Pour utiliser ce programme, il faut disposer d'un ordinateur équipé d'un coprocesseur mathématique. L'analyse par la méthode des probits n'est pas valable pour déterminer une concentration efficace moyenne (CE_{50} ou

---

40 Cette formule donne le même résultat que la formule d'Abbott, utilisée pour déterminer le pourcentage d'oeufs *non fécondés*. La formule d'Abbott sert à corriger la performance du témoin et est employée couramment en toxicologie aquatique (*cf.* tableau C.13). La formule de calcul du PDF donne le même résultat numérique que le calcul de la diminution de la fécondation, fondé sur les valeurs corrigées au moyen de la formule de l'ASTM (1990), mentionnée dans le tableau C.13 de l'annexe C. Le calcul effectué à l'aide de la formule «PDF» donne des pourcentages de diminution que l'on peut porter directement sur un graphique ou utiliser pour estimer une CI_p.

41 Actuellement, l'interpolation linéaire au moyen du programme BOOTSTRP semble la seule méthode couramment employée et facilement accessible pour établir l'intervalle de confiance d'une CI_p. Les chercheurs devraient s'informer des perfectionnements éventuels, étant donné que l'interpolation linéaire présente des lacunes, avec ou sans BOOTSTRP. Premièrement, les réactions se doivent d'être «non croissantes monotones» (EPA, 1989). Dans un essai portant sur des échinides, cela signifie qu'une concentration plus élevée ne doit pas donner lieu à un taux supérieur de fécondation. Ce n'est pas toujours le cas dans les analyses de toxicité et la méthode d'ajustement par interpolation linéaire peut fausser l'estimation de la CI_p. En deuxième lieu, la CI_p est interpolée à partir de deux concentrations d'encadrement et on n'utilise pas le reste de la relation entre la concentration et l'effet, comme ce serait le cas, par exemple, dans l'analyse par la méthode des probits aux fins de l'estimation d'une concentration létale par ajustement d'une droite en fonction de la répartition totale des données. Troisièmement, l'interpolation aux fins de l'estimation de la CI_p s'effectue selon une approche arithmétique plutôt que logarithmique de la concentration, ce qui influerait également sur la valeur obtenue.

CE_{25}), compte tenu des raisons mentionnées à la rubrique CI_p du glossaire.

Il faut imposer certaines limites élémentaires à l'estimation de la CI_p. L'estimation ne devrait pas se fonder sur une extrapolation (c.-à-d. qu'elle doit exiger des données en deçà et au delà du pourcentage d'effet recherché). Par exemple, aux fins de l'estimation de la CI_{25}, l'essai devrait comprendre au moins une concentration provoquant un effet supérieur à 25 % (mais inférieur à 100 %) et au moins une concentration provoquant un effet inférieur à 25 % (mais supérieur à 0 %). Cette exigence peut être levée lorsque, pour une raison quelconque, l'essai vise à établir une valeur extrême, telle que la CI_{05} ou la CI_{95}. Cependant, cet essai doit comprendre au moins une concentration provoquant un effet partiel comparable à celui de la CI_p visée (p. ex., un effet qui ne dépassera pas, par plus de 5 %, l'effet visé)[42]. La variabilité est forte près des extrêmes de la relation. Les effets observés de 0 % et de 100 %, notamment, contribuent rarement à l'estimation de la CI_p.

4.5.4 Autres plans et objets d'essai

Dans un essai à concentration unique, un test T est normalement la méthode qui convient le mieux à la comparaison des données obtenues pour la concentration d'essai et des données obtenues pour la concentration de contrôle. Les différents manuels de statistique donnent habituellement les directives d'exécution du test T. Lorsque le taux de fécondation dans la concentration d'essai est sensiblement inférieur à ce même résultat statistique dans la concentration de contrôle, on considère à juste titre que la substance analysée exerce un effet.

Il faut satisfaire aux exigences d'homogénéité de la variance et de normalité (annexe H, EPA, 1989; Gulley *et al.*, 1989), avant d'exécuter le test T classique. Lorsque les données ne répondent pas aux exigences, on peut exécuter un test non paramétrique, en suivant les conseils d'un statisticien. À ce jour, il semble qu'aucun test particulier ne fasse la norme.

Dans certains cas, l'essai comprendra un ensemble d'échantillons plutôt que différentes concentrations d'un échantillon unique de la substance à expérimenter. Il pourrait s'agir d'effluents non dilués rejetés par diverses industries ou d'échantillons d'eau de mer prélevés à différents endroits. Dans ce genre d'essai, on voudra peut-être mesurer l'écart entre chaque échantillon et la solution de contrôle. Le programme statistique TOXSTAT propose un certain nombre d'options pour ce faire, le test de Dunnett étant la méthode la mieux adaptée à une comparaison avec la solution de contrôle. On voudra peut-être déterminer s'il existe des écarts entre les différents échantillons, auquel cas le test statistique approprié sera celui de Tukey. Ces tests ne peuvent indiquer la CI_p ni la CSEO/CMEO de chaque échantillon analysé, mais ils devraient indiquer le taux de fécondation observé (TFO), ainsi que l'ampleur de l'écart entre cette valeur et le taux de fécondation de contrôle (TFC).

4.6 Produits toxiques de référence

L'utilisation courante de produits toxiques de référence est nécessaire pour évaluer, dans des conditions d'essai normalisées, la sensibilité relative des lots de gamètes soumis à l'essai ainsi que la précision et la

---

42 La qualité et la répartition des autres données de l'essai influent aussi sur la valeur estimative d'une CI_p extrême. On ne peut énoncer aucune ligne directrice rigoureuse sur la justesse requise d'une donnée simple quant à l'effet visé. La fiabilité de la CI_p dépendra toujours de l'étendue de l'intervalle de confiance.

justesse des données obtenues en laboratoire pour les produits toxiques de référence choisis (Environnement Canada, 1990d).

Il faut évaluer la sensibilité des gamètes aux produits toxiques de référence au moins une fois par mois de l'analyse de fécondation. La fréquence préférable et recommandée consiste en une évaluation aux deux semaines. L'essai portant sur le produit toxique de référence est plus utile quand on l'effectue en même temps que l'essai de toxicité proprement dit. Idéalement, on effectuerait un essai de référence pour chaque lot de gamètes soumis à un essai de toxicité.

Pour l'essai à l'étude, les critères de recommandation des produits toxiques de référence sont les suivants :

- facilité d'obtention à l'état pur;
- durée de conservation prolongée (stabilité);
- solubilité élevée dans l'eau;
- stabilité en solution aqueuse;
- risque minimum pour l'utilisateur;
- facilité et précision de l'analyse;
- courbe dose-effet satisfaisante pour les gamètes d'échinides;
- incidence connue du pH sur la toxicité du produit chimique utilisé dans l'essai;
- incidence connue de la salinité sur la toxicité du produit chimique utilisé dans l'essai.

Pour l'essai à l'étude, on recommande le cuivre comme produit toxique de référence[43]. On devrait évaluer la sensibilité des gamètes au moyen d'essais visant à déterminer la CI_p ou la CSEO/CMEO pour le cuivre et conformément aux méthodes et conditions énoncées dans le présent document. On devrait employer du sulfate de cuivre ou du chlorure de cuivre pour préparer des solutions mères nécessairement acides (pH 3 à 4). Ces solutions pourraient être utilisées immédiatement ou stockées à

---

43 Les différents groupes de chercheurs qui étudient la fécondation des oeufs d'échinides ne semblent pas privilégier une substance particulière comme produit toxique de référence. La plupart de ces groupes ne mentionnent pas les produits toxiques de référence ou négligent le sujet (*cf.* annexe C). Aux États-Unis, deux groupes ont utilisé le cuivre et l'azoture de sodium. Ces deux produits, ainsi que l'argent, sont ceux choisis par les laboratoires provinciaux de la Colombie-Britannique (renseignement obtenu de G. C. van Aggelen, ministère de l'Environnement de la Colombie-Britannique). Pour le cuivre, on a signalé des CI_{50} de 20 à 26 µg Cu/L et des coefficients de variation de 23 à 46 % (renseignement obtenu de G. A. Chapman, EPA; EPA, 1988). On dispose d'une information plus limitée sur l'azoture de sodium, qui ne figure pas dans le guide des produits toxiques de référence (Environnement Canada, 1990d). Les solutions mères d'azoture de sodium se conservent, au plus, pendant trois mois.

On peut expérimenter d'autres substances chimiques comme produits toxiques de référence. Le GITA (1991) a constaté, pour le cadmium, une concentration seuil d'effet (CSE) de 18 µg Cd/L pour les oursins verts et blancs. Le cadmium n'est probablement pas le produit chimique le plus souhaitable pour un usage normalisé, étant donné qu'il s'agit d'un produit toxique dangereux et bioaccumulatif. De plus, on a signalé que le cadmium est associé à une forte proportion d'oeufs présentant des anomalies et difficiles à classer au moment du dénombrement (renseignement obtenu de G. C. van Aggelen). Le phénol de qualité réactif peut être utile, étant donné qu'il s'agit d'un produit chimique organique, capable de compléter le cuivre inorganique. Le phénol est recommandé dans d'autres essais de toxicité d'Environnement Canada (1990a, 1990b et 1992b). On devrait préparer des solutions mères de phénol la journée même de l'utilisation. On a déjà utilisé le dodécyl sulfate de sodium dans des analyses de fécondation, mais cette substance présente des lacunes comme produit toxique de référence (Environnement Canada, 1990d).

l'abri de la lumière à 4 ± 2 °C pendant plusieurs semaines. La concentration de cuivre devrait être exprimée en mg Cu^{++}/L.

Pour les solutions de contrôle/de dilution, on utilisera de l'eau de mer naturelle ou reconstituée. Pour assurer un degré élevé de normalisation dans les essais portant sur le produit toxique de référence, on devrait ajuster la salinité de l'eau de contrôle/de dilution en fonction d'une valeur constante favorable aux gamètes, dans l'échelle 28 à 34 g/kg, de préférence 30g/kg.

On devrait mesurer, au moyen des méthodes chimiques appropriées (p. ex., APHA *et al.*, 1989), les concentrations du produit toxique de référence dans toutes les solutions mères. Au moment de préparer les solutions d'essai, on devrait prélever des aliquotes, au moins dans la solution de contrôle et dans les solutions à concentration inférieure, moyenne et supérieure, pour les analyser immédiatement ou les stocker aux fins d'une analyse ultérieure, dans l'éventualité d'une CI_p ou d'une CSEO aberrante (qui déborde l'intervalle d'alarme). Le cas échéant, les aliquotes seront stockées à l'abri de la lumière à 4 ± 2 °C. Les solutions de cuivre devraient subir un traitement de conservation avant d'être stockées (APHA *et al.*, 1989). Les aliquotes stockées nécessitant une mesure chimique devraient être analysées sans délai aussitôt l'essai de toxicité terminé. Le calcul de la CI_p ou de la CSEO devrait se fonder sur les concentrations mesurées, lorsqu'elles diffèrent suffisamment (c.-à-d. supérieures ou égales à 20 %) des concentrations nominales et lorsque la justesse des analyses chimiques est satisfaisante.

Un graphique de contrôle (Environnement Canada, 1990d) devrait être établi et mis à jour pour chaque produit toxique de référence. On porte les CI_p ou les CSEO successives sur le graphique et on les étudie pour déterminer si les résultats s'inscrivent dans un intervalle de ± 2 fois l'écart-type des valeurs obtenues dans les essais précédents. Pour chaque CI_p ou CSEO, on recalcule la moyenne géométrique, ainsi que son intervalle d'alarme (± 2 fois l'écart-type, calculé en fonction des données géométriques ou logarithmiques)[44], jusqu'à l'obtention de statistiques stables (EPA, 1989; Environnement Canada, 1990d).

Lorsque la CI_p ou la CSEO déborde l'intervalle d'alarme, il faut mettre en doute la sensibilité des gamètes et du système d'essai. Étant donné que cette situation peut survenir dans 5 % des cas, du simple fait du hasard, une valeur inférieure ou supérieure à la limite de l'intervalle d'alarme ne signifie pas nécessairement que la sensibilité du lot de gamètes ou que la précision des données toxicologiques, obtenues en laboratoire, soit en cause. Mais il s'agit d'un avertissement réel dans ce sens, qui commande de vérifier toutes les conditions de stockage et d'essai.

Aux fins de vérification, on peut comparer le taux de fécondation pour différents rapports spermatozoïdes:oeuf à l'échelle des valeurs déjà obtenues. Cette évaluation devrait fournir une indication utile de la viabilité décroissante des gamètes, comme ce pourrait être le cas à la fin d'une saison de reproduction.

Les résultats qui ne débordent pas l'intervalle d'alarme ne traduisent pas

---

44 Lorsque les CI_p ou les CSEO n'indiquent pas une distribution log-normale, une moyenne et un écart-type arithmétiques pourraient être plus appropriés. On recommande d'utiliser la CI_p, de préférence à la CSEO et même à la CSE, étant donné que la CI_p est une estimation ponctuelle, qui subit à un degré moindre l'influence des différentes concentrations et du facteur de dilution choisi pour l'essai.

nécessairement l'efficacité constante des travaux. Un laboratoire produisant des données très variables pour un produit toxique de référence aurait un intervalle d'alarme très étendu. Une nouvelle donnée simple pourrait fort bien s'inscrire dans cet intervalle, mais refléter néanmoins une variation indésirable des résultats. Environnement Canada (1990d) propose, sous toute réserve, un coefficient de variation de 20 ou de 30 %. Ce coefficient semble raisonnable, mais la question n'a pas été étudiée dans le contexte de l'essai sur la fécondation des oeufs d'échinides.

4.7 Considérations juridiques

Il faut s'assurer, avec le plus grand soin, que les échantillons prélevés et soumis à des essais seront recevables comme preuves en cas de poursuite judiciaire. À cette fin, les échantillons doivent être représentatifs de la substance échantillonnée, non contaminés par des substances étrangères, dûment identifiés (date, heure et lieu du prélèvement), documentés au regard des conditions et responsabilités de garde et analysés le plus tôt possible après le prélèvement. Les personnes responsables de l'essai et du procès-verbal doivent assurer la continuité de la preuve aux fins de la procédure judiciaire (McCaffrey, 1979), ainsi que l'intégrité des résultats de l'essai.

Section 5

Méthodes particulières pour l'essai de produits chimiques

La présente section énonce les directives particulières applicables à l'essai de produits chimiques. Ces instructions complètent les méthodes exposées à la section 4. Pour les produits chimiques, on exécute généralement un essai à concentrations multiples pour déterminer la CI_p ou la CSEO/CMEO. Les règlements qui régissent l'homologation des pesticides ou des catégories comparables de produits chimiques peuvent aussi prescrire trois répétitions, soit le nombre minimum requis pour l'analyse statistique des résultats.

5.1 Propriétés, étiquetage et stockage de l'échantillon

On devrait obtenir des renseignements sur les propriétés du produit chimique à éprouver, notamment sa solubilité dans l'eau, sa tension de vapeur, sa stabilité chimique, ses constantes de dissociation et sa biodégradabilité. Il faudrait consulter la fiche signalétique du produit, s'il en existe une. Ces renseignements sur les propriétés du produit chimique faciliteront l'identification des exigences particulières de manutention et d'essai, comme la ventilation obligatoire de l'installation. L'information sur la solubilité et la stabilité dans l'eau de mer et dans l'eau douce sera également utile pour l'interprétation des résultats. Lorsque la solubilité dans l'eau soulève des doutes ou des difficultés, il faudrait recueillir et consigner l'information sur les méthodes admissibles employées antérieurement pour la préparation des solutions aqueuses de ce produit. Il faudrait également recueillir et consigner les autres renseignements disponibles, notamment la formule structurelle, le degré de pureté, la description et le pourcentage des impuretés significatives, la présence et les quantités d'additifs et le coefficient de partage *n*-octanol-eau. On devrait aussi connaître une méthode d'analyse acceptable pour le produit chimique en milieu aqueux, aux concentrations prévues dans l'essai, ainsi que des données sur la précision et la justesse.

Dès réception du produit chimique, les contenants doivent être fermés hermétiquement et codés ou étiquetés, de manière à ce que le nom du produit, le fournisseur et la date de réception soient indiqués. Les conditions de stockage sont dictées par les propriétés du produit et concernent souvent la température et le besoin de protection contre la lumière. On devrait respecter les pratiques normalisées de manutention et de stockage du produit chimique.

5.2 Préparation des solutions d'essai

Dans la mesure du possible, on devrait préparer les solutions d'essai du produit chimique en ajoutant des aliquotes d'une solution mère préparée dans de l'eau de contrôle/de dilution. Lorsque la solution mère est composée d'eau douce ou distillée, on ajoute habituellement de la saumure ou des sels marins aux concentrations d'essai pour obtenir la salinité requise (*cf.* subdivision 2.3.4 et sous-section 3.4). On devrait déterminer, avant l'essai, la concentration et la stabilité du produit chimique dans la solution mère. Les solutions mères vulnérables à la photolyse devraient être protégées contre la lumière.

Dans le cas des solutions instables, il faut en préparer de nouvelles, selon les besoins.

Pour les produits chimiques qui ne se dissolvent pas facilement dans de l'eau, des solutions mères peuvent être préparées au moyen de la technique de la colonne génératrice (Billington *et al.*, 1988; Shiu *et al.*, 1988). La dispersion ultrasonique est un autre procédé possible mais moins recommandé, car il peut produire des gouttelettes non uniformes et de tailles différentes, susceptibles de migrer vers la surface du liquide ou donner lieu à des variations de la disponibilité biologique du produit chimique et, par conséquent, de sa toxicité. On ne devrait pas utiliser de solvants organiques, d'émulsifiants ou de dispersants pour accroître la solubilité du produit chimique, sauf lorsque ces substances pourraient être formulées avec le produit en cause dans son utilisation commerciale normale. Le cas échéant, on devrait préparer une solution de contrôle supplémentaire renfermant la même concentration d'agent solubilisant que la solution la plus concentrée du produit chimique à éprouver. Ces agents devraient être utilisés parcimonieusement, leur concentration ne devant pas dépasser 0,1 mL/L dans toute solution d'essai. Dans le cas des solvants, il serait préférable (EPA, 1985a; ASTM 1990) d'utiliser les produits suivants : le triéthylèneglycol et le diméthylformamide. On pourrait aussi utiliser le méthanol, l'éthanol et l'acétone, mais ces produits sont plus volatils.

5.3 Eau de contrôle/de dilution

L'eau de contrôle/de dilution peut être de l'eau de mer reconstituée, de l'eau de mer naturelle et non contaminée du laboratoire ou un échantillon d'un milieu récepteur lorsque l'essai concerne un endroit précis. Le choix de l'eau de contrôle/de dilution dépend de l'objet de l'essai.

On peut utiliser de l'eau de mer reconstituée quand un degré élevé de normalisation est nécessaire (p. ex., pour mesurer la toxicité d'un produit chimique par rapport à des valeurs obtenues ailleurs pour ce produit chimique ou d'autres produits). Dans toutes les dilutions et comme témoin de tous les essais, on devrait déterminer un ou plusieurs niveaux de salinité dans l'échelle 28 à 34 g/kg, conformément à la subdivision 4.3.2 (l'écart par rapport à la salinité de la solution de contrôle n'étant pas supérieur à 1 g/kg).

Lorsque l'objet de l'essai comprend l'évaluation de l'effet toxique d'un produit chimique sur un milieu récepteur particulier, on pourrait prélever des échantillons de ce milieu dans un endroit non contaminé par le produit chimique, puis les utiliser comme eau de contrôle/de dilution. Il peut s'agir, par exemple, d'évaluer l'effet toxique, sur une nappe d'eau particulière, de déversements réels ou potentiels ou de l'application intentionnelle d'un produit chimique (p. ex., la pulvérisation d'un pesticide). L'eau de mer naturelle ou l'eau reconstituée du laboratoire peut également être utilisée aux fins d'une simulation partielle du milieu récepteur, surtout dans un cas de toxicité perturbatrice du milieu récepteur ou lorsque des contraintes logistiques empêchent le prélèvement et l'utilisation des échantillons (*cf.* 4.1.1). L'eau de mer du laboratoire dans laquelle sont gardés les adultes peut aussi servir dans d'autres situations, notamment dans l'évaluation préalable ou intralaboratoire de la toxicité du produit chimique.

Pour mesurer l'effet de la salinité sur la toxicité du produit chimique à l'étude, on devrait réaliser des essais distincts et

parallèles pour au moins deux niveaux de salinité. Cependant, il ne faut pas oublier qu'une salinité qui se situe hors de la plage de 28 à 34 g/kg peut affecter le taux de fécondation[45]. Pour ces essais, l'eau de contrôle/de dilution devrait provenir d'une même source. Il peut s'agir d'eau reconstituée (*cf.* 2.3.4) ou d'eau de mer naturelle, diluée avec de l'eau douce non contaminée, conformément aux normes établies.

5.4 Observations et mesures

En plus des observations sur la toxicité, décrites dans la sous-section 4.4, il faut procéder à d'autres observations et mesures dans les essais de produits chimiques.

Pendant la préparation, on devrait examiner chaque solution d'essai afin de déceler la présence de produits chimiques et d'observer son évolution (p. ex., l'odeur, la couleur, l'opacité, la précipitation ou la floculation). Toute observation devrait être consignée.

Il est souhaitable et recommandé d'analyser des aliquotes de solutions d'essai afin de déterminer, au moins, les concentrations supérieure, moyenne et inférieure et les concentrations de contrôle des produits chimiques auxquelles les gamètes sont exposés[46].

Ces aliquotes devraient être conservées, stockées et analysées au moyen de méthodes éprouvées permettant d'établir la concentration du produit chimique visé en solution aqueuse. Dans tous les essais au cours desquels on mesure les concentrations, la toxicité devrait être calculée et exprimée en fonction des concentrations mesurées, sauf s'il y a lieu de croire que les mesures chimiques ne sont pas exactes.

5.5 Résultats et calculs

Les résultats statistiques des essais de produits chimiques seront les résultats normalisés, décrits dans les subdivisions 4.5.2 et 4.5.3 (CSEO/CMEO ou CI_p ou ces deux résultats).

Dans le cas d'un témoin contenant un solvant, l'essai n'est pas valable lorsque le taux de fécondation est sensiblement moindre que le taux observé dans la solution de contrôle contenant seulement de l'eau.

---

45 Pour évaluer l'effet de la salinité sur la toxicité d'une substance, en dehors de la plage restreinte favorable aux gamètes, une autre forme d'essai au moyen d'un organisme euryhalin pourrait donner de meilleurs résultats que l'analyse de fécondation.

46 Il n'est pas nécessaire d'effectuer ces analyses dans tous les cas, en raison des limites de l'exercice, du coût ou de l'information qui indique déjà la stabilité du produit chimique dans des conditions similaires à celles de l'essai. Les analyses chimiques sont particulièrement recommandées lorsque les solutions d'essai sont aérées, que la substance à éprouver est volatile, insoluble ou se précipite et lorsqu'on sait que cette substance est absorbée par le matériau des récipients d'essai (EPA, 1985a). Dans certains cas, on peut exiger la mesure des concentrations du produit chimique dans les solutions d'essai (p. ex., aux fins de l'homologation des pesticides).

Section 6

Méthodes particulières pour l'essai d'échantillons d'effluents, d'élutriats et de lixiviats

La présente section énonce les directives particulières applicables à l'essai d'échantillons d'effluents, d'élutriats et de lixiviats. Ces instructions complètent les méthodes exposées à la section 4.

6.1 Prélèvement, étiquetage, transport et stockage des échantillons

Les contenants utilisés pour le transport et le stockage des échantillons d'effluents, de lixiviats et d'élutriats doivent être fabriqués d'un matériau non toxique. Les contenants en verre ou à pellicule de Teflon[MC] sont recommandés parce qu'ils sont inertes et qu'ils réduisent l'absorption de produits chimiques. On peut aussi utiliser, comme deuxième choix, les contenants de polyéthylène ou de polypropylène, fabriqués pour le transport et le stockage de l'eau potable. Les contenants doivent être neufs ou nettoyés à fond et rincés avec de l'eau non contaminée. On devrait aussi les rincer avec l'échantillon à prélever. Il vaudrait mieux remplir entièrement les contenants pour éviter les vides d'air.

La plupart des essais d'échantillons d'effluents, de lixiviats ou d'élutriats seront réalisés à l'écart du lieu de prélèvement, dans un laboratoire. Dans la mesure du possible, l'essai d'un échantillon d'effluent et de lixiviat devrait être entrepris dans les 24 h et, au plus tard, dans les 72 h qui suivent le prélèvement. L'essai d'un échantillon prélevé pour extraction aqueuse et l'essai de l'élutriat qui suit devraient être entrepris le plus tôt possible. L'extraction devrait débuter dans les deux semaines qui suivent le prélèvement (idéalement dans la première semaine) et les essais doivent être entrepris au plus tard six semaines après le prélèvement (Environnement Canada, 1993). On devrait suivre la méthode concernant la préparation d'élutriats contenue dans le document d'Environnement Canada (1993). L'essai de ces élutriats doit commencer dans les 72 h suivant leur préparation ou selon les indications prescrites dans un règlement ou un protocole.

Un échantillon de deux litres convient parfaitement à un essai à concentrations multiples à l'écart du lieu de prélèvement (p. ex., des concentrations de 100, 50, 25, 12,5, 6,3, 3,2 et 1,6 %), aux analyses chimiques courantes et à tout ajustement ou reprise d'essai. Les échantillons seront plus petits pour les essais à concentration unique (*cf.* 4.5.4). Au moment du prélèvement, chaque contenant doit être rempli, fermé hermétiquement et étiqueté ou codé. L'information de base devrait comprendre le type d'échantillon, le lieu, la date et l'heure du prélèvement ainsi que le nom de l'échantillonneur. On ne devrait pas soumettre à un essai en laboratoire l'échantillon reçu dans un contenant non étiqueté ou non codé. De même, on ne devrait pas éprouver systématiquement les échantillons reçus dans des contenants qui ne sont pas remplis à capacité parce que des produits toxiques volatils peuvent s'échapper dans l'air ambiant. Cependant, le chercheur peut procéder à l'essai, lorsque la volatilité du produit n'est pas un facteur.

On devrait conserver au frais (entre 1 et 7 °C et, idéalement, à 4 ± 2 °C) tous les échantillons d'effluents ou de lixiviats pendant toute la durée du transport et du stockage . Au moment du prélèvement, on devrait porter les échantillons chauds (supérieurs à 7 °C) à une température de 1 à 7 °C avec de la glace ou des sachets frigorifiques. Au besoin, on utilisera des produits frigorifiques ou un autre moyen de réfrigération pour maintenir la température entre 1 et 7 °C pendant le transport, en prenant soin que les échantillons ne gèlent pas.

À l'arrivée au laboratoire, on peut ajuster immédiatement ou pendant la nuit la température d'une aliquote de l'effluent ou du lixiviat exigé, en fonction de la température d'essai, pour ensuite exécuter cet essai. Toute partie de l'échantillon, conservée pour des essais ultérieurs, devrait être conservée dans l'obscurité, dans des contenants fermés hermétiquement et à une température de 4 ± 2 °C.

Sauf indication contraire, les conditions de température pendant le transport et le stockage des élutriats ainsi que des échantillons destinés à l'extraction et à l'essai ultérieur de l'élutriat devraient être conformes aux instructions susmentionnées.

6.2 Préparation des solutions d'essai

Il faut agiter vigoureusement les contenants d'échantillons, juste avant de les vider, afin d'assurer la resuspension des solides décantables. Les sous-échantillons (c'est-à-dire les échantillons répartis dans deux ou plus de deux contenants) doivent être mélangés, afin d'assurer leur homogénéité. S'il est nécessaire de procéder à un nouveau stockage, l'échantillon composite (ou une partie de cet échantillon) devrait être replacé dans les contenants des sous-échantillons et stocké (*cf.* sous-section 6.1) jusqu'au moment de l'utilisation.

On peut passer les échantillons dans un filtre de 5 µm avant l'utilisation. Bien que facultatif, ce procédé est de pratique courante. La présence de fortes concentrations de matières inorganiques ou organiques en suspension dans un échantillon pourrait inhiber la fécondation ou endommager directement les gamètes. Dans certains types d'eaux résiduaires traitées, de fortes concentrations de matières biologiques peuvent également concourir à la toxicité des échantillons en raison de la production d'ammoniac ou de nitrites (Servizi et Gordon, 1986). La filtration permettrait aussi d'enlever les organismes filtrés que pourraient contenir les eaux résiduaires traitées et les autres organismes susceptibles de dévorer les gamètes.

La filtration enlèvera les matières en suspension qui sont propres à l'échantillon et qui peuvent contribuer à sa toxicité ou la modifier. Pour s'assurer que la filtration n'occulte pas la toxicité de l'échantillon, on pourrait réaliser deux essais parallèles, avec un échantillon filtré et un autre non filtré. Exception faite de la filtration, il faudrait traiter pareillement les deux aliquotes de l'échantillon.

6.3 Eau de contrôle/de dilution

Pour les essais de conformité réalisés avec des échantillons d'effluent ou de lixiviat, on devrait utiliser, comme eau de contrôle/de dilution, de l'eau de mer du laboratoire normalement fournie aux adultes ou de l'eau provenant du milieu récepteur. Étant donné que les résultats pourraient être différents pour les deux sources d'eau, on doit fixer les objectifs de l'essai avant d'effectuer ce

choix. On devrait également tenir compte des difficultés et des coûts du transport, puisque l'utilisation du milieu récepteur augmente le volume de liquide à expédier au laboratoire. Cependant, les difficultés et les coûts du transport ne seront peut-être pas un facteur important dans ce genre d'analyse à petite échelle.

L'utilisation d'un échantillon d'eau réceptrice prélevée en amont, peut être souhaitable pour fournir de l'information sur l'effet toxique potentiel d'un effluent, d'un lixiviat ou d'un élutriat sur un milieu récepteur particulier (se reporter à l'analyse raisonnée de la subdivision 4.3.2). Un exemple important d'une telle situation consisterait à mesurer l'effet sublétal à l'extrémité d'une zone de mélange des eaux, en vertu des exigences réglementaires propres à un lieu donné. Les conditions de prélèvement, de transport et de stockage des échantillons du milieu récepteur devraient être conformes aux instructions énoncées à la sous-section 6.1. Tout échantillon du milieu récepteur, utilisé comme eau de contrôle/de dilution pour l'essai d'un effluent ou d'un lixiviat, devrait être filtré conformément aux recommandations établies, au moyen d'un filtre de 1,0 µm (*cf.* 4.1.1). Pour utiliser un échantillon du milieu récepteur comme eau de contrôle/de dilution, une solution de contrôle distincte devrait être préparée avec l'eau de mer du laboratoire fournie aux adultes.

Pour les essais nécessitant un degré supérieur de normalisation, on devrait utiliser de l'eau de mer reconstituée comme eau de contrôle/de dilution. Il pourrait s'agir, par exemple, d'un essai visant à comparer la toxicité d'un effluent, d'un lixiviat ou d'un élutriat à la toxicité des échantillons prélevés ou mis à l'essai ailleurs.

En tant que méthode normalisée d'évaluation des substances toxiques dans les eaux résiduaires, on doit ajuster la salinité de toutes les solutions d'essai et de contrôle en fonction d'une même valeur, habituellement en ajustant une aliquote de l'échantillon conformément aux instructions énoncées à la subdivision 4.3.2 (l'écart entre les différentes solutions d'essai n'étant pas supérieur à 1 g/kg, dans l'échelle 28 à 34 g/kg). On recommande les méthodes décrites à la subdivision 2.3.4, qui préconisent l'utilisation de saumure ou de sel marin commercial. Lorsque l'objectif consiste à évaluer l'effet total des eaux résiduaires, y compris leur faible salinité (ou leur salinité élevée), à des fins de surveillance ou de conformité, on pourrait réaliser l'essai sans ajuster la salinité. L'exercice pourrait servir aux deux fins (évaluer les produits toxiques et assurer la conformité) en comprenant l'essai à salinité ajustée et un deuxième essai à salinité non ajustée ou comprenant un ensemble de témoins de salinité (*cf.* 4.1.4).

6.4 Observations et mesures sur les échantillons

On devrait mesurer le taux de fécondation conformément aux instructions énoncées à la sous-section 4.4.

On devrait observer la couleur, la turbidité, l'odeur et l'homogénéité (c-à-d., la présence de matières flottantes ou de solides décantables) de l'échantillon d'effluent, de lixiviat ou d'élutriat, pendant la préparation des solutions d'essai. En outre, on devrait consigner les changements évidents qui surviennent au moment de la dilution avec l'eau ou pendant l'essai, comme la précipitation, la floculation, le moussage, l'odeur et les variations de couleur et de turbidité.

Dans le cas des échantillons d'effluent présentant un volume appréciable de solides, il vaut mieux mesurer les matières en suspension et décantables à l'arrivée de l'échantillon (APHA *et al.*, 1989), dans la description générale de l'effluent et à titre de caractéristique susceptible d'influer sur les résultats de l'essai de toxicité.

6.5 Résultats et calculs

Les essais de surveillance et de conformité avec les exigences réglementaires devraient normalement comprendre, au moins, trois aliquotes non diluées de l'échantillon et trois aliquotes d'une solution de contrôle. Selon les exigences réglementaires précisées, les essais de conformité pourraient porter sur une concentration unique (100 % de l'échantillon, sauf indication contraire) ou pourraient permettre de déterminer la CSEO/CMEO ou la CI_p.

Les essais de toxicité peuvent viser d'autres fins, comme l'identification des sources de toxicité dans une usine ou de l'évolution de la toxicité résultant des changements apportés aux procédés ou au traitement des déchets. Ces essais peuvent porter sur des concentrations multiples ou sur une seule concentration (100 % de l'échantillon ou une dilution appropriée, ainsi qu'une solution de contrôle). Les essais à concentration unique sont souvent un moyen économique d'établir la présence ou l'absence d'une toxicité mesurable ou d'évaluer la toxicité relative d'un nombre important d'échantillons. Les résultats de ces essais dépendraient logiquement des objectifs du projet, mais pourraient comprendre des cotes arbitraires de réussite ou d'échec ou un pourcentage de diminution de la fécondation pour une concentration donnée. La sous-section 4.5 fournit des instructions qui sont pertinentes au regard de l'analyse statistique et de la déclaration des résultats d'une série d'essais à concentration unique portant sur des échantillons différents.

Section 7

Méthodes particulières pour l'essai d'échantillons de milieux récepteurs

Le lecteur trouvera ci-après les directives applicables à l'essai d'échantillons de milieux récepteurs. Ces instructions complètent les méthodes exposées à la section 4.

7.1 Prélèvement, étiquetage, transport et stockage des échantillons

Les méthodes d'étiquetage, de transport et de stockage des échantillons devraient être conformes aux méthodes décrites à la sous-section 6.1. Les essais devraient être entrepris le plus tôt possible, de préférence moins de 24 h et pas plus de 72 h après le prélèvement.

7.2 Préparation des solutions d'essai

On devrait agiter les contenants avant de les vider, afin d'assurer l'homogénéité des échantillons. Les sous-échantillons devraient être mélangés, comme le prévoit la sous-section 6.2.

On peut passer les échantillons dans un filtre de 5 µm avant l'utilisation. Pour s'assurer que la filtration ou l'élimination de matières solides ne modifient pas la toxicité des échantillons, on pourrait effectuer des essais avec des échantillons filtrés et non filtrés, comme le prévoit la sous-section 6.2.

7.3 Eau de contrôle/de dilution

Pour les échantillons de milieux récepteurs recueillis près d'un point de rejet d'eaux résiduaires, d'un déversement de produits chimiques ou d'une autre source ponctuelle de contamination possible, on peut prélever parallèlement de l'eau en amont et l'utiliser comme eau de contrôle/de dilution pour les échantillons d'aval. L'information (*cf.* 4.1.1) sur l'incidence et les effets possibles de l'eau d'amont utilisée comme eau de contrôle/de dilution est pertinente dans un tel cas. L'eau de contrôle/de dilution devrait être prélevée le plus près possible de la ou des sources de contamination, mais en amont de leur zone d'influence. Des études de courantométrie ou de dispersion à l'aide d'indicateurs pourraient s'imposer pour déterminer le lieu acceptable du prélèvement. L'eau de contrôle/de dilution devrait toujours être filtrée (*cf.* subdivision 4.1.1 et sous-sections 6.2 et 6.3).

Lorsque l'eau d'amont est utilisée comme eau de contrôle/de dilution, on devrait préparer une solution de contrôle distincte avec de l'eau de mer du laboratoire, normalement fournie aux échinides adultes. Les conditions d'essai et les méthodes de préparation et d'évaluation devraient être les mêmes pour chaque solution de contrôle et conformes aux directives données aux sous-sections 4.1 et 5.3.

Des contraintes logistiques, le manque d'information sur le terrain, les effets toxiques prévus ou d'autres caractéristiques du lieu pourraient empêcher ou interdire l'utilisation de l'eau d'amont comme eau de contrôle/de dilution. Dans un tel cas, on devrait utiliser l'eau de mer du laboratoire dans laquelle on garde normalement les

adultes. On pourrait ajuster la salinité de l'eau de mer du laboratoire pour reproduire en partie l'eau d'amont (*cf.* 4.1.1), mais les restrictions de salinité imposées pour ce genre d'étude empêchent toute manipulation importante.

7.4 Observations et mesures sur les échantillons

On devrait observer la couleur, la turbidité, le moussage, la précipitation et d'autres caractéristiques des échantillons et des solutions, comme le prévoit la sous-section 6.4, pendant la préparation des solutions et ultérieurement, en cours d'essai. Ces données s'ajoutent aux observations toxicologiques, décrites à la sous-section 4.4.

7.5 Résultats et calculs

Les résultats statistiques des essais portant sur des échantillons de milieux récepteurs devraient être conformes aux options et aux démarches prévues aux sous-sections 4.5 et 6.5. Ces résultats seront fondés sur le taux de fécondation par rapport aux témoins.

Les essais de surveillance et de conformité devraient normalement comprendre, au minimum, trois aliquotes de l'échantillon non diluées et autant d'aliquotes d'une solution de contrôle. Lorsque les échantillons de milieux récepteurs sont probablement toxiques et que l'on veut déterminer le degré de dilution nécessaire pour permettre la reproduction normale des échinides, on devrait effectuer un essai exhaustif pour établir la CSEO/CMEO ou la CI_p, conformément aux méthodes décrites à la section 4, avec un échantillon non dilué comme concentration supérieure des solutions analysées.

Certains essais pourraient porter sur une série d'échantillons se distinguant, par exemple, par de l'eau de mer provenant de différents lieux, mais tous analysés à concentration maximale. Les méthodes décrites aux subdivisions 4.5.2 et 4.5.3 sont celles à observer pour les tests statistiques et la déclaration des résultats.

Section 8

Méthodes particulières pour l'essai d'échantillons de sédiments et de solides assimilés

Le présent chapitre énonce des instructions générales applicables aux essais portant sur des liquides extraits d'échantillons de sédiments et de solides assimilés, comme des boues et des sols. Ces instructions viennent s'ajouter aux méthodes décrites à la section 4. Il importe de souligner que le terme «sédiment» est employé pour des raisons de commodité, mais il devrait inclure des substances solides assimilées comme les sols et les boues provenant des installations industrielles et municipales, qui peuvent contribuer à la pollution des eaux naturelles ou qui doivent être soumises à des essais pour d'autres raisons.

8.1 Généralités

De plus en plus, on considère que l'évaluation de la toxicité des sédiments est nécessaire pour assurer la protection de l'environnement, notamment dans le contexte de l'immersion de déchets en mer, comme le prévoit la partie IV de la *Loi canadienne sur la protection de l'environnement*.

L'étude de la fécondation des oeufs d'échinides est appropriée pour évaluer la toxicité des liquides extraits des sédiments. Cette étude comprend une méthode rapide de comparaison d'extraits de sédiments contaminés (Long *et al.*, 1990). L'analyse comparative de sept essais portant sur des liquides extraits de sédiments a montré que l'essai mené avec des embryons d'échinodermes et l'essai bactériologique Microtox étaient les plus sensibles (Pastorok et Becker, 1989). Les essais de toxicité sublétale, y compris une étude sur la fécondation à l'aide de l'oursin violet de l'Atlantique dans l'eau de porosité de sédiments, étaient beaucoup plus sensibles qu'un essai classique portant sur des amphipodes et tout le sédiment (Carr et Chapman, 1992).

Les directives générales qui suivent s'appliquent à l'étude de la fécondation des oeufs d'échinides, dans l'optique de l'essai des liquides extraits de sédiments. Le présent rapport n'a pas pour mission de décrire l'étude sur le terrain et le prélèvement des sédiments, non plus que l'extraction des substances aqueuses et autres. Des directives détaillées sur la cueillette, la manutention, le transport et le stockage des échantillons de sédiments (*cf.* 8.1.1) sont mentionnées dans un document d'Environnement Canada (1993). Ce document comporte également des détails sur la méthode d'extraction de liquides (c.-à-d. eau de porosité, élutriat ou extrait de solvant; sous-section 8.2) à partir de sédiments en vue d'essais de toxicité et d'analyses chimiques ultérieurs. Les directives contenues dans ce document, de même que celles comprises dans la présente méthode, devraient être consultées et suivies. On peut trouver des renseignements sur le fondement de ces directives dans divers ouvrages (p. ex., Mudroch et Macknight, 1991), dans les articles cités dans un document d'Environnement Canada (1993) et dans des études de synthèse sur ce sujet (p. ex., Geisy et Hoke, 1989; McLeay et Sprague, 1991).

L'étude de la fécondation des oeufs d'oursins ne convient pas à l'essai des sédiments en soi (c.-à-d. les solides), mais elle permet d'éprouver des liquides provenant des sédiments. Ces liquides peuvent être des lixiviats, des élutriats, des extraits de solvants ou de l'eau de porosité. Par souci de concision, on utilise l'expression «essai de sédiments», bien que l'essai porte véritablement sur les liquides provenant des sédiments.

8.1.1 Étiquetage, transport et stockage des échantillons

Les méthodes générales utilisées pour l'étiquetage, le transport et le stockage des échantillons de sédiments devraient être conformes aux instructions énoncées à la sous-section 6.1. L'intervalle de température est celui mentionné au même endroit, et il est à souligner que les échantillons ne doivent geler ni complètement, ni partiellement et ne doivent pas sécher (ASTM, 1991b; Environnement Canada, 1993).

Dans le cas des liquides provenant des sédiments, les contenants et les méthodes de manutention devraient être conformes aux instructions énoncées à la sous-section 6.1 pour les élutriats. Si on utilise un solvant non aqueux pour extraire des substances, on devrait conserver le liquide dans un contenant en verre pour s'assurer qu'il ne sera pas affecté par le solvant et qu'il n'y aura pas lixiviation de substances dans l'échantillon.

L'essai des échantillons devrait commencer le plus tôt possible après le prélèvement. L'extraction du liquide devrait avoir lieu dans les deux semaines qui suivent le prélèvement des échantillons, idéalement dans la première semaine. L'essai ne doit pas commencer plus de six semaines après le prélèvement des échantillons (Environnement Canada, 1993)[47]. L'essai du liquide provenant des sédiments devrait commencer moins de 72 h après la préparation des solutions (Environnement Canada, 1993) ou conformément aux instructions énoncées dans le règlement ou le protocole pertinent.

8.1.2 Préparation de l'échantillon

L'homogénéisation des échantillons pourrait s'imposer avant l'essai, selon les caractéristiques de l'échantillon et les objectifs de l'essai. Le cas échéant, le mélange doit être homogène. Il faut mélanger les sous-échantillons (c.-à-d. un même échantillon stocké dans deux ou plusieurs contenants). Pour stocker à nouveau après le mélange, on devrait replacer l'échantillon composite ou une partie de cet échantillon dans les contenants des sous-échantillons.

8.1.3 Observations et mesures sur les échantillons

On devrait observer la couleur, la turbidité, le moussage, la précipitation et d'autres caractéristiques des sédiments et de tout liquide provenant des sédiments pendant la préparation des solutions d'essai, conformément aux instructions énoncées à la sous-section 6.4.

---

47 La toxicité et la géochimie des sédiments contaminés provenant du port de Hamilton auraient changé après un stockage de plus d'une semaine; cependant, les données devant étayer cette affirmation n'ont pas été fournies (Brouwer *et al.*, 1990). L'exécution des essais dans les deux semaines suivant l'échantillonnage est conforme aux techniques normalisées actuelles des États-Unis (ASTM, 1991b). On a déterminé une période de stockage maximale acceptable de six semaines dans des rapports préliminaires d'Environnement Canada (1990e, 1990f), en raison des difficultés d'ordre pratique qui se posent pour des périodes plus courtes, y compris le délai nécessaire s'il faut effectuer des analyses chimiques préliminaires.

8.1.4 Sédiments de contrôle ou de référence

Il faut évaluer un ou plusieurs échantillons de contrôle ou de référence (sédiment non pollué), en procédant de la même manière que pour le sédiment à l'étude. Bien que les méthodes d'essai prévoient une solution à blanc ou un témoin qui ne contienne pas les substances dérivées du sédiment à l'étude, l'expérience montre qu'un tel témoin peut s'avérer insuffisant aux fins d'un essai de toxicité acceptable. Environnement Canada et d'autres laboratoires ont souvent relevé des effets toxiques apparents dans d'autres genres d'essais portant sur des sédiments non pollués. Par conséquent, on devrait inclure un ou plusieurs sédiments de contrôle ou de référence («propres») à titre d'échantillon, dans chaque essai portant sur un sédiment ou sur une série de sédiments, pour contribuer à l'établissement d'un niveau de référence ou «normal». À cette fin, il vaudrait mieux adopter un sédiment de référence non contaminé et normalisé ou une série de sédiments de référence aux caractéristiques différentes, que l'on pourrait apparier aux caractéristiques des sédiments à l'étude. Les sédiments de contrôle ou de référence devraient présenter les mêmes propriétés physiques et chimiques générales que les sédiments à l'étude. On devrait, surtout, s'efforcer d'obtenir la même distribution granulométrique et le même équilibre entre substances organiques et inorganiques (ASTM, 1991a; 1991b; McLeay et Sprague, 1991).

Il n'existe pas de méthode exclusive pour traiter les résultats obtenus pour le sédiment de contrôle ou de référence. Lorsque le sédiment de contrôle ne présente aucune toxicité, les résultats obtenus pour le sédiment à l'étude sont réputés valables. Dans le cas contraire, on ne semble pas disposer d'une méthode normalisée, pour adapter ces résultats en fonction du sédiment à l'étude[48].

On devrait faire preuve de prudence dans l'interprétation des résultats. Il vaudrait mieux vérifier les écarts considérables entre les résultats obtenus pour le sédiment de référence et le sédiment à l'étude. Les tests requis devraient être réalisés avec le concours d'un statisticien, lorsque des observations en double ou des essais répétés sont possibles.

8.2 Essai de liquides provenant des sédiments et des solides assimilés

Les produits toxiques que contiennent les sédiments ou les sols peuvent évoluer en phase aqueuse et affecter les organismes présents dans les eaux naturelles. La phase aqueuse peut être un liquide provenant du sol ou du sédiment (p. ex., de l'eau de porosité) ou un liquide utilisé pour traiter l'échantillon et extraire les produits toxiques potentiels (p. ex., un élutriat).

Un liquide provenant d'un sédiment soumis à un essai de toxicité devrait vraisemblablement appartenir à l'une ou l'autre des quatre grandes catégories suivantes :

1) De l'eau de porosité, c'est-à-dire de l'eau qui remplit les intervalles entre les particules et qui pourrait procéder d'un échange avec l'eau sus-jacente composant l'estuaire, la baie, etc., que l'on extrait, en général, du sédiment par centrifugation ou par compression (ASTM, 1991b).

---

48 Brouwer *et al.* (1990) ont tiré parti du témoin en exprimant la performance mesurée du sédiment éprouvé en un pourcentage de la performance du sédiment de contrôle ou de référence, au moyen d'une méthode propre à un essai bactériologique. Cependant, l'essai n'a porté que sur une seule concentration des deux sédiments et on ne semble pas avoir employé cette technique dans un essai à concentrations multiples.

2) De l'eau, habituellement douce, utilisée pour obtenir un extrait aqueux des substances que contient le sédiment (c.-à-d. un élutriat), par exemple, en agitant un échantillon dans une solution d'eau pure. Cette catégorie n'est pas très appropriée pour l'étude de la fécondation des oeufs d'échinides.

3) De l'eau de contrôle/de dilution ou toute autre eau pure dont la salinité est égale à celle de l'eau de mer et qui a servi à obtenir un extrait aqueux de la manière décrite au point 2 ci-dessus.

4) Des solvants autres que l'eau (p. ex., des solvants organiques), utilisés pour piéger des substances de l'échantillon de sédiment (Schiewe *et al.*, 1985; True et Heyward, 1990).

L'eau des trois premières catégories pourrait être analysée comme un échantillon liquide normal, conformément aux méthodes de base énoncées à la section 4 et à celles décrites à la section 6 sur les effluents, les élutriats et les lixiviats.

Pour ce qui est de la quatrième catégorie, à savoir les solvants, l'option privilégiée consiste à utiliser la même concentration de solvant dans chaque récipient d'essai. On porte l'eau de contrôle/de dilution à utiliser dans l'essai à la même teneur en solvant que la concentration supérieure de l'échantillon à expérimenter. Des concentrations inférieures sont préparées avec l'eau de contrôle/de dilution modifiée pour que l'effet du solvant, le cas échéant, soit le même dans tous les récipients. On devrait disposer d'un témoin sans solvant, en plus du témoin avec solvant. De plus, il serait préférable de réaliser un essai distinct, pour déterminer la CSEO/CMEO ou la CI_p du solvant.

8.2.1 Préparation des solutions d'essai

Un document d'Environnement Canada (1993) contient des directives précises sur l'extraction de liquides (p. ex., eau de porosité, élutriat ou solvant) à partir des sédiments. Ces directives devraient être consultées et suivies lors de la préparation de sédiments pour les essais de fécondation chez les échinides.

Le mélange de «sous-échantillons» du liquide provenant du sédiment (p. ex., des extraits successifs) devrait être conforme aux instructions énoncées à la sous-section 6.2. Les sous-échantillons ne seraient pas mélangés lorsque l'objectif de la recherche consiste à déterminer la toxicité relative des extraits successifs. On recommande de passer le liquide dans un filtre de 5 µm, comme pour les échantillons types d'eau de mer naturelle. On devrait déterminer le pH et la teneur en oxygène dissous de l'échantillon, en tenant compte des instructions données aux subdivisions 4.1.2 et 4.1.3.

Une fois le liquide obtenu, on prépare les concentrations d'essai de la manière courante (*cf.* 4.1.2). Comme pour les effluents, les lixiviats et les élutriats, il pourrait s'agir d'un essai à concentration unique (en plus d'un témoin) aux fins de conformité ou d'un essai à concentrations multiples pour déterminer la CSEO/CMEO ou la CI_p (*cf.* sous-section 6.2). Les méthodes d'obtention et d'analyse du liquide provenant des échantillons de sédiments de contrôle ou de référence devraient être les mêmes que pour le sédiment à l'étude.

8.2.2 Eau de contrôle/de dilution

Lorsque l'échantillon de sédiment est prélevé dans la mer ou dans un estuaire et que le liquide se compose surtout d'eau de mer, dont la salinité correspond à

l'échelle courante pour ce genre d'essai (28 à 34 g/kg), il est recommandé d'observer les méthodes universelles décrites à la section 4.

Lorsque le liquide provenant du sédiment se compose surtout d'eau douce ou d'une eau dont la salinité est inférieure à celle de l'eau de mer normale, c'est-à-dire une eau comparable à celle d'un estuaire, on devrait normalement ajuster la salinité à la hausse. La méthode normalisée consiste à ajuster la salinité de toutes les solutions d'essai et de contrôle en fonction d'une même valeur (l'écart entre chaque solution n'étant pas supérieur à 1g/kg dans l'échelle 28 à 34 g/kg). Pour ce faire, on ajuste habituellement une aliquote de l'échantillon, conformément aux méthodes décrites à la subdivision 4.3.2. On recommande d'utiliser de la saumure ou du sel marin commercial, comme il est mentionné à la subdivision 2.3.4.

8.2.3 Résultats et calculs

Les résultats des essais portant sur des liquides provenant de sédiments devraient être conformes aux options et aux démarches énoncées aux sous-sections 4.5 et 6.5.

Section 9

Procès-verbal de l'essai

Le procès-verbal de l'essai devrait décrire les substances et les méthodes utilisées ainsi que les résultats de l'essai. À partir de ce document, le lecteur devrait être en mesure de savoir si les conditions et les méthodes utilisées rendent les résultats admissibles pour l'utilisation prévue.

On peut citer les méthodes et conditions qui sont communes à une série continue d'essais (p. ex., essais de toxicité courants à des fins de surveillance ou de conformité) et qui sont conformes aux dispositions du présent document; on peut aussi présenter, en annexe, un rapport général définissant le mode opératoire normalisé. Dans les cas où des choix sont possibles, la démarche retenue devrait être précisée. Le rapport général devrait faire état des renseignements méthodologiques énumérés aux sous-sections 9.2 à 9.5. Un rapport particulier énonçant les résultats de l'essai devrait renfermer les renseignements indiqués dans les sous-sections 9.1, 9.6 et 9.7. Des programmes de surveillance particuliers pourraient exiger la mention de certains éléments d'information dans le procès-verbal de l'essai (p. ex., le mode opératoire et les résultats des essais exigeant un ajustement du pH ou la modification du procédé d'aération ou d'oxygénation). Les autres détails concernant la réalisation et les résultats de l'essai qui ne sont pas consignés au procès-verbal devraient être versés aux dossiers du laboratoire, de sorte qu'on puisse obtenir les renseignements voulus si une vérification de l'essai s'avère nécessaire.

9.1 Substance à expérimenter

- Type, source et description de l'échantillon (produit chimique, effluent, lixiviat, élutriat, milieu récepteur; lieu et méthode de prélèvement; détails sur la nature, l'aspect et les propriétés de l'échantillon, ainsi que son volume ou son poids).

- Renseignements sur l'étiquetage ou le codage de la substance à expérimenter.

- Détails sur les modalités de prélèvement, de transport et de stockage des échantillons (p. ex., échantillon instantané, discontinu ou composite, description du contenant et température de l'échantillon à la réception et pendant le stockage).

- Identité de la ou des personnes ayant prélevé ou fourni l'échantillon.

- Date et heure du prélèvement de l'échantillon, de son arrivée au laboratoire ainsi que du début et de la fin de l'essai définitif.

9.2 Organismes soumis à l'essai

- Espèces et source.

- Description des conditions de garde des adultes (installations, éclairage, source et qualité de l'eau, prétraitement de l'eau, taux et méthode de renouvellement de l'eau, densité des organismes dans les réservoirs, températures dans les

réservoirs, type de nourriture et fréquence d'alimentation, maladies).

- Pourcentage hebdomadaire de mortalité parmi les adultes gardés en laboratoire.

9.3 Installations et appareils

- Nom et adresse du laboratoire.
- Nom de la ou des personnes ayant effectué l'essai.
- Description des systèmes de contrôle de la température dans l'installation d'essai.
- Description des récipients (nom courant, taille, forme, type de matériau).

9.4 Eau de contrôle/de dilution

- Type et source de l'eau utilisée comme eau de contrôle/de dilution.
- Type et quantité de tout produit chimique ajouté à l'eau de contrôle/de dilution.
- Détails sur le prélèvement et le stockage de l'eau de contrôle/de dilution, lorsqu'elle provient du milieu récepteur en amont.
- Prétraitement de l'eau (ajustement de la température, désaération, taux d'aération, durée, etc.).
- Variables de la qualité de l'eau (*cf.* 2.3.4), mesurées avant l'essai ou au début de l'essai de toxicité.

9.5 Méthode d'essai

- Brève mention de la méthode employée, lorsqu'il s'agit d'une méthode normalisée (p. ex., conforme au présent document), ainsi que des options choisies.
- Plan et description, lorsqu'il s'agit d'un mode opératoire spécialisé ou d'une méthode normalisée modifiée.
- Méthode employée pour préparer la solution mère ou la solution d'essai de produits chimiques.
- Résultats de toute analyse chimique des solutions d'essai et mention des méthodes analytiques employées.
- Exécution d'un essai préalable ou de détermination d'ordre de grandeur.

9.6 Conditions de l'essai

- Renseignements sur l'aération de l'échantillon avant l'essai (le cas échéant, préciser le taux, la durée et la méthode).
- Nombre, concentration, volume et profondeur des solutions d'essai, y compris des solutions de contrôle et le nombre d'aliquotes.
- Estimation du nombre de spermatozoïdes par récipient et du rapport spermatozoïdes:oeuf.
- Caractéristiques générales de l'éclairage de l'installation d'essai.
- Description de toute solution d'essai soumise à un ajustement du pH ou à une filtration, y compris la méthode employée.
- Résultats de toute mesure chimique des solutions d'essai (p. ex., la concentration du produit chimique et les matières en suspension).

- Température, salinité, pH et oxygène dissous (mg/L et pourcentage de saturation), d'après les mesures des aliquotes de contrôle et des solutions de concentration supérieure, moyenne et inférieure au début de l'essai.

- Conditions et méthodes de mesure de la CI_p ou de la CSEO/CMEO des produits toxiques de référence.

9.7 Résultats de l'essai

- Aspect des solutions d'essai et changements constatés pendant l'essai.

- Nombre d'oeufs fécondés et non fécondés dans chaque récipient à la fin de l'essai et taux de fécondation.

- Résultats de l'essai de détermination d'ordre de grandeur, le cas échéant.

- CSEO/CMEO ou CI_p, comme mesures du taux de fécondation; différence significative minimale du pourcentage de fécondation, lorsque la CSEO/CMEO sont établies; tests statistiques employés et toute transformation requise des données.

Résultats des essais toxicologiques pertinents portant sur les produits toxiques de référence et moyenne géométrique (± 2 fois l'écart-type) obtenue pour les mêmes produits toxiques lors des essais antérieurs réalisés au laboratoire.

Références

Abernethy, S.G. et G.F. Westlake, «Guidelines for pH Adjustment of Effluent Samples for Toxicity Testing», ISBN 0-7729-5947-1, Rexdale (Ont.), ministère de l'Environnement de l'Ontario, Direction des ressources en eau, 1989, 11 p.

Anderson, S.L., M.P. Carlin et A.L. Suer, «Effluent and Ambient Toxicity Programs in the San Francisco Bay Region», p. 153-164 *in: Proc. Seventeenth Annual Aquatic Toxicity Workshop: Nov. 5-7, 1990,* P Chapman, F. Bishay, E. Power, K. Hall, L. Harding, D. McLeay, M. Nassichuk et W. Knapp (éd.), Vancouver (C.-B.), Pêches et Océans Canada, *Can. Tech. Rept. Fisheries Aquatic Sciences*, nº 1774, 1991.

Anderson, S.L. et T.J. Norberg-King, «Precision of Short-term Chronic Toxicity Tests in the Real World», *Environ. Toxicol. Chem., 10*: 143-145.

APHA, AWWA et WPCF (American Public Health Association, American Water Works Association et Water Pollution Control Federation), «Toxicity Test Methods for Aquatic Organisms», partie 8000, p. 8-1 à 8-143, *in : Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 17e éd., Washington, DC, APHA, AWWA et WPCF, 1989.

Armstrong, F.A.J. et D.P. Scott, «Photochemical Dechlorination of Water Supply for Fish Tanks with Commercial Water Sterilizers», *J. Fish. Res. Board Can., 31*: 1881-1885, 1974.

ASTM (American Society for Testing and Materials), «Proposed Standard Guide for Conducting Toxicity Tests with Sperm and Eggs of Sea Urchins and Other Echinoids», ASTM Subcommittee E-47.01 on Aquatic Toxicology (G.A. Chapman, président), American Society for Testing and Materials, Philadelphie, PA, ébauche nº 4 (5 fév. 1990) 1990, 61 p.

ASTM, «Standard Guide for Conducting 10-day Static Sediment Toxicity Tests with Marine and Estuarine Amphipods», *1991 Annual Book of ASTM Standards*, Philadelphie, PA, American Society for Testing and Materials, E1367-90, p. 1052-1075, 1991a.

ASTM, «Standard Guide for Collection, Storage, Characterization, and Manipulation of Sediments for Toxicity Testing», *1991 Annual Book of ASTM Standards*, Philadelphie, PA, American Society for Testing and Materials, 1991, E1391-90, p. 1105-1119, 1991b.

Barnes, R.D., *Invertebrate Zoology*, 3e éd., W.B. Saunders Co., Philadelphie, PA, 1974, 870 p.

Beak, «Toxicity Testing Quality Assurance Test Round Results», préparé pour le California Regional Water Quality Control Board, Beak Consultants Ltd., Brampton (Ont.), rapp. nº 880903, 1988, 11 p.

Bidwell, J.P. et S. Spotte, «Artificial Seawaters. Formulas and Methods»,

Jones and Bartlett Pub. Inc., Boston, MA, 1985.

Billington, J.W., G.-L. Huang, F. Szeto, W.Y. Shiu et D. MacKay, «Preparation of Aqueous Solutions of Sparingly Soluble Organic Substances: I. Single Component Systems», *Environ. Toxicol. Chem., 7*: 117-124, 1988.

BML (Bodega Marine Laboratory), «BML Sea Urchin Fertilization Assay Protocol Procedure», Univ. California, BML, manuscrit, 1991, 3 p.

Bouck, G.R., «Gasometer: An Inexpensive Device for Continuous Monitoring of Dissolved Gases and Supersaturation» *Trans. Amer. Fish. Soc., 111*: 505-516, 1982.

Bougis, P., «Sur l'effet biologique du cuivre en eau de mer», *C.R. Acad. Sci. Paris, 249*: 326-328, 1959.

Brouwer, H., T. Murphy et L. McArdle, «A Sediment-contact Bioassay with *Photobacterium phosphoreum*», *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 9, p. 1353-1358, 1990.

Carr, R.S. et D.C. Chapman, «Comparison of Solid-phase and Pore-water Approaches for Assessing the Quality of Marine and Estuarine Sediments», *Chemistry and Ecology*, 1992.

CCMRE (Conseil canadien des ministres des Ressources et de l'Environnement), «Recommandations pour la qualité des eaux au Canada», Groupe de travail sur les lignes directrices relatives à la qualité de l'eau, Environnement Canada, Ottawa (Ont.), 1987.

Chapman, G.A., «Sea Urchin Sperm Test Protocol for Interlaboratory Comparison», manuscrit, Environmental Protection Agency, Pacific Ecosystems Branch, Newport, OR, 1991.

Chapman, G.A., «Sea Urchin *(Strongylocentrotus purpuratus)* Fertilization Test Method», ébauche manuscrite finale, Environmental Protection Agency, Pacific Ecosystems Branch, Newport, OR, 1992, 35 p.

Cherr, G.N., J.M. Shenker, C. Lunkmark et K.O. Turner, «Toxic Effects of Selected Bleached Kraft Mill Effluent Constituents on the Sea Urchin Sperm Cell, «*Environ. Toxicol. Chem., 6*: 561-569, 1987.

Dinnel, P.A. et Q.J. Stober, «Methodology and Analysis of Sea Urchin Embryo Bioassays», Univ. of Washington, School Fisheries, circ. nº 85-3, 1985, 19 p.

Dinnel, P.A. et Q.J. Stober, «Application of the Sea Urchin Sperm Bioassay to Sewage Treatment Efficiency and Toxicity in Marine Waters», *Mar. Environ. Res., 21*: 121-133, 1987.

Dinnel, P.A., Q.J. Stober, S.C. Crumley et R.E. Nakatani, «Development of a Sperm Cell Toxicity Test for Marine Waters», *in*: *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Fifth Conference*, J.G. Pearson, R.B. Foster et W.E. Bishop (éd.), Amer. Soc. Testing and Materials, Philadelphie, PA, ASTM STP No. 766, p. 82-98, 1982.

Dinnel, P.A., J.M. Link et Q.J. Stober, «Improved Methodology for a Sea Urchin Sperm Cell Bioassay for Marine

Waters», *Arch. Environ. Contam. Toxicol., 16*: 23-32, 1987.

Dinnel, P.A., G.G. Pagano et P.S. Oshida, «A Sea Urchin Test System for Marine Environmental Monitoring», *in: Echinoderm Biology. Proc. Sixth Internat. Echinoderm Conf.*, R.D. Burke, P.V. Mladenov, P. Lambert et R.L. Parsley (éd.), du 23 au 28 août 1987, Victoria, A.A. Balkema, Rotterdam, Pays-Bas, 1988, p. 611-619.

Dinnel, P.A., J.M. Link, Q.J. Stober, M.W. Letourneau et W.E. Roberts, «Comparative Sensitivity of Sea Urchin Sperm Bioassays to Metals and Pesticides», *Arch. Environ. Contam. Toxicol., 18*: 748-755, 1989.

Drzewina, A. et G. Bohn, «Action de l'argent métallique sur le sperme et les larves d'Oursin», C.R. *Acad. Sci. Paris, 182*: 1651-1652, 1926.

Environnement Canada, «Méthode d'essai biologique : essai de létalité aiguë sur la truite arc-en-ciel», rapport SPE 1/RM/9, Ottawa (Ont.), Environnement Canada, 1990a, 53 p.

Environnement Canada, «Méthode d'essai biologique : essai de létalité aiguë sur l'épinoche à trois épines (*Gasterosteus aculeatus*)», rapport SPE 1/RM/10, Ottawa (Ont.), Environnement Canada, 1990b, 49 p.

Environnement Canada, «Méthode d'essai biologique : essai de létalité aiguë sur *Daphnia* spp.», rapport SPE 1/RM/11, Ottawa (Ont.), Environnement Canada, 1990c, 61 p.

Environnement Canada, «Document d'orientation sur le contrôle de la précision des essais de toxicité au moyen de produits toxiques de référence», rapport SPE 1/RM/12, Ottawa (Ont.), Environnement Canada, 1990d, 91 p.

Environnement Canada, «Interim Contaminant Testing Guidelines for Ocean Disposal - Atlantic Region», rapport préliminaire, Dartmouth (N.-É.), Environnement Canada, mai 1990.

Environnement Canada, «Interim Contaminant Testing Guidelines for Ocean Disposal - Pacific & Yukon Region», rapport préliminaire, North Vancouver (C.-B.), Environnement Canada, novembre 1990.

Environnement Canada, «Méthode d'essai biologique : essai de reproduction et de survie sur le cladocère *Ceriodaphnia dubia*», rapport SPE 1/RM/21, Ottawa (Ont.), Environnement Canada, 1992a, 78 p.

Environnement Canada, «Méthode d'essai biologique : essai de croissance et de survie sur des larves de tête-de-boule», rapport SPE 1/RM/22, Ottawa (Ont.), Environnement Canada, 1992b, 72 p.

Environnement Canada, «Document d'orientation sur le prélèvement, la manutention, le transport, le stockage et la manipulation de sédiments en vue de leur caractérisation chimique et d'essais de toxicité», Conservation et Protection, Ottawa (Ont.), Environnement Canada, à paraître en 1993.

EPA (Environmental Protection Agency), «Acute Toxicity Test for Freshwater Fish, Standard Evaluation Procedure», Environmental Protection Agency, Hazard Evaluation Division, EPA-540/9-85-006, Washington, DC, 1985a, 12 p.

EPA, «Acute Toxicity Test for Estuarine and Marine Organisms (Estuarine Fish 96-hour Acute Toxicity Test), Standard Evaluation Procedure», Environmental Protection Agency, Hazard Evaluation Division, EPA-540/9-85-009, juin 1985, Washington, DC, 1985b.

EPA, «Sea Urchin (*Arbacia punctulata*) Fertilization Test Method 1008», *in : Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Marine and Estuarine Organisms*, C.I. Weber, W.B. Horning II, D.J. Klemm, T.W. Neiheisel, P.A. Lewis, E.L. Robinson, J.R. Menkedick et F.A. Kessler (éd.), Environmental Protection Agency, EPA/600/4-87/028, Cincinnati, OH, p. 239-272, 1988.

EPA, «Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms», 2e éd., EPA-600/4 89/001 [préparé par C.I. Weber, W.H. Peltier, R.J. Norberg-King, W.B. Horning, F.A. Kessler, J.R. Menkedick, T.W. Neiheisel, P.A. Lewis, D.J. Klemm, W.H. Pickering, E.L. Robinson, J. Lazorchak, L.J. Wymer et R.W. Freyberg], Cincinnati, OH, Environmental Protection Agency, 1989, 248 p.

EPA, «Methods for Aquatic Toxicity Identification Evaluations. Phase I Toxicity Characterization Procedures. (Second edition)» [édité par T.J. Norberg-King, D.I. Mount, E.J. Durhan, G.T. Ankley, L.P. Burkhard, J.R. Amato, M.T. Lukasewycz, M.K. Schubauer-Berigan et L. Anderson-Carnahan], Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, Environmental Research Laboratory, EPA/600/6-91/003, National Effluent Toxicity Assessment Center Tech. Rept. 18-90, Duluth, MN, 1991a.

EPA, «Toxicity Identification Evaluation: Characterization of Chronically Toxic Effluents, Phase I» [préparé par T.J. Norberg-King, D.I. Mount, J.R. Amato, D.A. Jensen et J.A. Thompson], Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, EPA/600/6-91/005, National Effluent Toxicity Assessment Center Tech. Rept. 05-91, Duluth, MN, 1991b.

ERCEES (ERC Environmental and Energy Services), «Standard Operating Procedure, Echinoderm Sperm-fertilization Bioassay», San Diego, CA, manuscrit, 1990, 4 p.

Esposito, A., M. Cipollara, G. Corsale, E. Ragucci, G.G. Gordiano et G. Pagano, «The Sea Urchin Bioassay in Testing Pollutants», *in: Strategies and Advanced Techniques for Marine Pollution Studies: Mediterranean Sea*, C.S. Giam et J.J.-M. Dou (éd.), NATO ASI Series, vol. G9, Springer-Verlag, Berlin, p. 447-455, 1986.

EVS, «Sand Dollar Bioassay. Sea Urchin Bioassay», EVS Consultants, North Vancouver (C.-B.), protocole, p. 128-136, 1989.

Geisy, J.P. et R.A. Hoke, «Freshwater Sediment Toxicity Bioassessment: Rationale for Species Selection and Test Design», *Journal of Great Lakes Research*, vol. 15, p. 539-569, 1989.

GITA (Groupe intergouvernemental sur la toxicité aquatique), «The Halifax Sea Urchin Fertilization Test Workshop», du 30 avril au 2 mai 1990, Environnement Canada, Conservation et Protection, Dartmouth (N.-É.), rapport non catalogué, août 1991, 1991, 16 p.

Greenwood, P.J. et T. Bennett, «Some Effects of Temperature-salinity Combinations on the Early Development of the Sea Urchin *Parechinus angulosus* (Leske. Fertilization», *J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 51*: 119-131, 1981.

Gulley, D.D., A.M. Boelter et H.L. Bergman, «TOXSTAT Release 3.2», University of Wyoming, Laramie, WY, 1989, 18 p. + disquette.

Himmelman, J.H., H. Guderley, G. Vignault, G. Drouin et P.G. Wells, «Response of the Sea Urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*, to Reduced Salinities; Importance of Size, Acclimation, and Interpopulation Differences», *Can. J. Zool., 62*: 1015-1021, 1984.

Himmelman, J.H. et D.H. Steele, «Foods and Predators of the Green Sea Urchin *Strongylocentrotus droebachiensis* in Newfoundland Waters», *Mar. Biol., 9*: 315-322, 1971.

Hoadley, L., «Certain Effects of the Salts of the Heavy Metals on the Fertilization Reaction in *Arbacia punctulata*», *Biol. Bull., 44* (6): 255-279, 1923.

Johnson, A., P. Halliman, K. Seiders et D. Davis, «Quality of Grays Harbor Pulp and Paper Mill Effluents, March-June 1989», Washington State Dept. Ecology, Environ. Investigations and Lab. Services Program, Olympia, WA, (cité dans NCASI, 1992), 1990.

Jonczyk, E., K.G. Doe, P.G. Wells et S.G. Yee, «Technical Evaluation of the Sea Urchin Fertilization Test: Proceedings of a Workshop in Dartmouth, Nova Scotia», *in : Proc. Seventeenth Annual Aquatic Toxicity Workshop: Nov. 5-7, 1990*, P. Chapman, F. Bishay, E. Power, K. Hall, L. Harding, D. McLeay, M. Nassichuk et W. Knapp (éd.), Vancouver (C.-B.), Pêches et Océans, *Can. Tech. Rept Fisheries Aquatic Sciences*, nº 1774, *p.* 323-330, 1991.

Karnofsky, D.A. et E.B. Simmel, «Effects of Growth-inhibiting Chemicals on the Sand-dollar Embryo, *Echinarachnius parma*», *Prog. Exp. Tumor Res., 3*: 254-295, 1963.

Kobayashi, N., «Fertilized Sea Urchin Eggs as an Indicatory Material for Marine Pollution Bioassay, Preliminary Experiments», *Publ. Seto Mar. Biol. Lab., 18*(6): 379-406, 1971.

Kobayashi, N., «Comparative Sensitivity of Various Developmental Stages of Sea Urchins to Some Chemicals», *Marine Biol., 58:* 163-171, 1980.

Kobayashi, N., «Marine Ecotoxicological Testing with Echinoids», *in: Ecotoxicological Testing for the Marine Environment. Vol. I*, G. Persoone, E. Jaspers et C. Claus (éd.), Université de Gand et Inst. Mar.

Scient. Res., Bredene, Belgique, p. 341-405, 1984.

Lillie, F.R., «Studies of Fertilization. X. The Effects of Copper Salts on the Fertilization Reaction in *Arbacia* and a Comparison of Mercury Effects», *Biol. Bull., 41:* 125-143, 1921.

Long, E.R., M.F. Buchman, S.M. Bay, R.J. Breteler, R.S. Carr, P.M. Chapman, J.E. Hose, A.L. Lissner, J. Scott et D.A. Wolfe, «Comparative Evaluation of Five Toxicity Tests with Sediments from San Francisco Bay and Tomales Bay, CA», *Environ. Toxicol. Chem., 9:* 1193-1214, 1990.

Masters, J.A., M.A. Lewis, D.H. Davidson et R.D. Bruce, «Validation of a Four-day *Ceriodaphnia* Toxicity Test and Statistical Considerations in Data Analysis», *Environ. Toxicol. and Chem., 10:* 47-55, 1991.

McCaffrey, L., «The Role of Toxicity Testing in Prosecutions Under Section 14(1)(a) of the *Environmental Protection Act, 1971* and Section 32(1) of the *Ontario Water Resources Act*», *Proceedings of the Fifth Annual Aquatic Toxicity Workshop, Hamilton, Ontario, November 7-9, 1978*, rapport technique du Service des pêches et des sciences de la mer nº 862, Ottawa (Ont.), Pêches et Environnement Canada, p. 15-22, 1979.

McCormick, J.M. et J.V. Thiruvathukal, *Elements of Oceanography*, W.B. Saunders Co., PA, 1976, 346 p.

McGibbon, S. et A.G.S. Moldan, «Routine Toxicity Testing of Toxicants Using a Sea Urchin Gamete Bioassay», *Mar. Pollut. Bull., 17(2):* 68-72, 1986.

McLeay, D.J. et J.B. Sprague, «Ten-day Test for Sediment Lethality Using Marine or Estuarine Infaunal Amphipods: Review of Literature for Subject-specific Information of Value in Developing Environment Canada's Biological Test Method», rapport manuscrit préparé pour le Groupe intergouvernemental sur la toxicité aquatique, West Vancouver (C.-B.), McLeay Associates Ltd., 1991, 45 p.

Meador, J.P., B.D. Ross, P.A. Dinnel et S.J. Picquelle, «An Analysis of the Relationship Between a Sand-dollar Embryo Elutriate Assay and Sediment Contaminants from Stations in an Urban Embayment of Puget Sound, Washington», *Mar. Environ. Res., 30:* 251-272, 1990.

MECAS, «Echinoderm Sperm Cell Toxicity Test Protocol», MEC Analytical Systems, Inc., Tiburon, CA, manuscrit, 1990, 3 p.

Meinkoth, N.A., «The Audubon Society Field Guide to North American Seashore Creatures», A.A. Knopf, New York, 1981.

Miller, J., E. Jonczyk, D. Hart et G.R. Craig, «Fertilization Assay with Echinoids: Interlaboratory Evaluation of Test Options», rapport présenté à Environnement Canada, Beak Consultants Ltd., Brampton (Ont.), 1992.

Ministère de l'Environnement de la Colombie-Britannique, «Echinoderm Sperm Inhibition Bioassay», Columbie-Britannique, ministère de

l'Environnement, Aquatic Toxicity Lab., manuscrit inédit, 1990, 5 p.

Muchmore, D. et D. Epel, «The Effects of Chlorination of Wastewater on Fertilization in Some Marine Invertebrates», *Mar. Biol., 19*: 93-05, 1973.

Mudroch, A. et S.D. Macknight, *CRC Handbook of Techniques for Aquatic Sediments Sampling*, Boca Raton, FL, CRC Press, Inc., 1991, 208 p.

Nacci, D., E. Jackim et R. Walsh, «Comparative Evaluation of Three Rapid Marine Toxicity Tests: Sea Urchin Early Embryo Growth Test, Sea Urchin Sperm Cell Toxicity Test and Microtox», *Environ. Toxicol. Chem., 5:* 521-526, 1986.

NCASI (National Council of the Paper Industry for Air and Stream Improvement), «NCASI Echinoderm Sperm/egg Bioassay Test Protocol», National Council of the Paper Industry for Air and Stream Improvement, Inc., Anacortes, WA, manuscrit, 1991, 9 p.

NCASI, «Marine Chronic Bioassays -- Technical Evaluations and Effluent Responses with the Echinoderm Sperm/egg Test», National Council of the Paper Industry for Air and Stream Improvement, New York, NY, Tech. Bull. No. 627, 1992, 73 p.

Norberg-King, T.J., «An Interpolation Estimate for Chronic Toxicity: The ICp Approach», Environmental Protection Agency, Environ. Res. Lab.-Duluth, Duluth, MN, Tech. Report 05-88 of National Effluent Toxicity Assessment Center, sept. 1988, 1988, 12 p.

NRC (National Research Council), «Laboratory Animal Management. Marine Invertebrates», Inst. Lab. Animal Resources, Committee on Marine Invertebrates, National Academy Press, Washington, DC, 1981, 382 p.

NWAS (Northwestern Aquatic Sciences), «Test Protocol, Echinoderm Sperm Fertilization Test», Northwestern Aquatic Sciences, Newport, OR, protocole n° NAS-XXX-SP/DE, 1990, 5 p.

Osborne, J. et C. Leeder, «Acute and Chronic Toxicity of Base Oil and Cuttings from Three Wells Drilled in the Beaufort Sea», *in : Drilling Wastes*, F.R. Engelhardt, J.P. Ray et A.H. Gillam (éd.), Elsevier Science Publishers Ltd., Londres, p. 481-494, 1989.

Oshida, P.S., T.K. Goochey et A.J. Mearns, «Effects of Municipal Wastewater on Fertilization, Survival, and Development of the Sea Urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*», *in : Biological Monitoring of Marine Pollutants*, J. Vernberg, A. Calabrese, F.P. Thurberg et W.B. Vernberg (éd.), Academic Press, New York, p. 389-402, 1981, 559 p.

Pagano, G., M. Cipollaro, G. Corsale, A. Esposito, E. Ragucci et G.G. Giordano, «pH-induced Changes in Mitotic and Developmental Patterns in Sea Urchin Embryogenesis. I. Exposure of Embryos. II. Exposure of Sperm», *Teratogen. Carcinogen. Mutagen., 5:* 101-112; 113-121, 1985.

Pagano, G., M. Cipollaro, G. Corsale, A. Esposito, E. Ragucci,

G.G. Giordano et N.M. Trieff, «The Sea Urchin: Bioassay for the Assessment of Damage from Environmental Contaminants», *in: Community Toxicity Testing*, J. Cairns Jr. (éd.), American Society for Testing and Materials, Philadelphie, PA, ASTM STP No. 920, p. 66-92, 1986.

Pagano, G., A. Esposito, P. Bove, M. de Angelis, A. Rota et G.G. Giordano, «The Effects of Hexavalent and Trivalent Chromium on Fertilization and Development in Sea Urchins», *Environ. Res., 30:* 442-452, 1983.

Pastorok, R.A. et D.S. Becker, «Comparative Sensitivity of Bioassays for Assessing Sediment Toxicity in Puget Sound», *Oceans '89, An International Conference Addressing Methods for Understanding the Global Ocean, Sept. 18-21, 1989, Seattle, Washington*, publication nº 89CH2780-5 de l'IEEE, Marine Technology Society, Oceanic Engineering Society et Institute of Electrical and Electronics Engineers, p. 431-436, 1989.

Rocchini, R.J., M.J.R. Clark, A.J. Jordan, S. Horvath, D.J. McLeay, J.A. Servizi, A. Sholund, H.J. Singleton, R.G. Watts et R.H. Young, «Provincial Guidelines and Laboratory Procedures for Measuring Acute Lethal Toxicity of Liquid Effluents to Fish», ministère de l' Environnement de la Colombie-Britannique, Victoria (C.-B.), 1982, 18 p.,

Rue, W.J., J.A. Fava et D.R. Grothe, «A Review of Inter- and Intralaboratory Effluent Toxicity Test Method Variability», *in: Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation: 10th volume*, W.J. Adams, G.A. Chapman et W.G. Landis (éd.), American Society for Testing and Materials, Philadelphie, PA, ASTM STP 971, p. 190-203, 1988.

Schiewe, M.H., E.G. Hawk, D.I. Actor et M.M. Krahn, «Use of a Bacterial Bioluminescence Assay to Assess Toxicity of Contaminated Marine Sediments», *Journal canadien des sciences halieutiques et aquatiques*, vol. 42, p. 1244-1248, 1985.

Schimmel, S.C., G.E. Morrison et M.A. Heber, «Marine Complex Effluent Toxicity Program: Test Sensitivity, Repeatability and Relevance to Receiving Water Toxicity», *Environ. Toxicol. Chem., 8:* 739-746 [*Arbacia punctulata*], 1989.

Sergy, G., «Recommendations on Aquatic Biological Tests and Procedures for Environment Protection, C&P, DOE», Edmonton, (Alb.), Environnement Canada, juillet 1987.

Servizi, J.A. et R.W. Gordon, «Detoxification of TMP and CTMP Effluents Alternating in a Pilot Scale Aerated Lagoon», *Pulp Paper Can., 87* (11): T404-409, 1986.

Shiu, W.Y., A. Maijanen, A.L.Y. Ng et D. MacKay, «Preparation of Aqueous Solutions of Sparingly Soluble Organic Substances: II. Multicomponent Systems - Hydrocarbon Mixtures and Petroleum Products», *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 7, p. 125-137, 1988.

Sprague, J.B. et D.J. McLeay, «Echinoid Fertilization Assays. Tabulation of Methods Used by Major Groups and

Authors», rapport manuscrit, Sprague Assoc. Ltd, Guelph (Ont.), 1991, 37 p.

Starr, M., «Examen des mécanismes de coordination entre la ponte de certains invertébrés marins et la poussée printanière du phytoplancton», thèse de doctorat, Université Laval, Québec, 1990, 133 p.

Starr, M., J.H. Himmelman et J.-C. Therriault, «Direct Coupling of Marine Invertebrate Spawning with Phytoplankton Blooms», *Science, 247:* 1071-1074, 1990.

Storer, T.A., R.L. Usinger, R.C. Stebbins, et J.W. Nybakken, *General Zoology*, 6e éd., McGraw-Hill Book Co., New York, 1979.

Strathmann, M.F., «Phylum Echinodermata, Class Echinoidea», chapitre 25, *in: Reproduction and Development of Marine Invertebrates of the Northern Pacific Coast. Data and Methods for the Study of Eggs, Embryos, and Larvae*, M.F. Strathmann 1987a, Univ. of Washington Press, Seattle, WA, p. 511-534, 1987.

Suter, G.W. II, A.E. Rosen, E. Linder et D.F. Parkhurst, «Endpoints for Responses of Fish to Chronic Toxic Exposures», *Environ. Toxicol. Chem., 6:* 793-809, 1987.

Thurman, H.V., *Introductory Oceanography*, Columbus, OH, Charles E. Merrill Publ. Co., 1975, 441 p.

True, C.J. et A.A. Heyward, «Relationships Between Microtox Test Results, Extraction Methods, and Physical and Chemical Compositions of Marine Sediment Samples», *Toxicity Assessment*, vol. 5, p. 29-45, 1990.

van Aggelen, G.C., «Echinoderm Toxicity Testing: A Chronic Marine Bioassay», ministère de l'Environnement de la Colombie-Britannique, Data Standards Group, North Vancouver (C.-B.), manuscrit inédit, 1988, 2 p.

Venables, B., «*Mysidopsis* sp.: Life History and Culture», rapport inédit d'un atelier tenu à Gulf Breeze, Floride, les 15 et 16 octobre 1986, Amer. Petroleum Inst., déc. 1986, Gulf Breeze, FL, 1986.

Wells, P.G., «L'oursin commun (*Strongylocentrotus droebachiensis*) utilisé comme organisme de test biologique et comme indicateur biologique de la pollution dans les eaux côtières canadiennes» Environnement Canada, Ottawa, *Bulletin de la lutte contre les déversements 7(5):* 114-120,

Wells, P.G., «Marine Ecotoxicological Tests with Zooplankton», p. 215-256, *in: Ecotoxicological Testing for the Marine Environment*, G. Persoone, E. Jaspers et C. Claus (éd.), vol. I, Université de Gand et Inst. Mar. Scient. Res., Bredene, Belgique, 1984.

Williams, D.A., «A Test for Differences Between Treatment Means when Several Dose Levels Are Compared with a Zero Dose Control», *Biometrics, 27:* 103-118, 1991.

Williams, D.A., «The Comparison of Several Dose Levels with a Zero Dose Control», *Biometrics, 28:* 519-532, 1972.

Annexe A

Membres du Groupe intergouvernemental sur la toxicité aquatique*

Gouvernement fédéral, Environnement Canada

P. G. Wells
PE. Dartmouth (N.-É.)

P. Jackman
St. John's (T.-N.)

K. G. Doe
Dartmouth (N.-É.)

W. R. Parker
Dartmouth (N.-É.)

S. J. Wade
Dartmouth (N.-É.)

J. D. Vaughan
Dartmouth (N.-É.)

N. Bermingham
Longueuil (Québec)

C. Blaise
Longueuil (Québec)

D. Saint-Laurent
Longueuil (Québec)

G. Elliott
Edmonton (Alberta)

R. G. Watts
North Vancouver (C.-B.)

S. G. Yee
North Vancouver (C.-B.)

D. Moul
North Vancouver (C.-B.)

K. E. Day
Institut national de recherche sur les eaux
Burlington (Ontario)

A. K. Kwan
Institut national de recherche sur les eaux
Burlington (Ontario)

C. Boutin
Service canadien de la faune
Hull (Québec)

J. Osborne
Bureau de la gestion des déchets
Hull (Québec)

M. Bonnell
Direction de la santé des écosystèmes
Hull (Québec)

D. MacGregor
Direction des affaires réglementaires et de l'intégration des programmes
Hull (Québec)

R. P. Scroggins
Direction du développement technologique
Hull (Québec)

---

* Au mois de novembre 1992.

G. A. Sergy
Direction du développement technologique
Edmonton (Alberta)

Gouvernement fédéral, Pêches et Océans Canada

R. Stevens
Direction de l'océanographie et des contaminants
Ottawa (Ontario)

Gouvernements provinciaux

C. Bastien
Ministère de l'Environnement du Québec
Sainte-Foy (Québec)

S. G. Abernethy
Ministère de l'Environnement de l'Ontario
Rexdale (Ontario)

C. M. Neville
Ministère de l'Environnement de l'Ontario
Rexdale (Ontario)

D. G. Poirier
Ministère de l'Environnement de l'Ontario
Rexdale (Ontario)

I. R. Smith
Ministère de l'Environnement de l'Ontario
Toronto (Ontario)

G. F. Westlake (président)
Ministère de l'Environnement de l'Ontario
Rexdale (Ontario)

B. Bayer
Ministère de l'Environnement du Manitoba
Winnipeg (Manitoba)

J. Somers
Alberta Environmental Centre
Edmonton (Alberta)

K. Smiley
Alberta Environmental Centre
Vegreville (Alberta)

S.H. Horvath
Ministère de l'Environnement de la Colombie-Britannique
Vancouver (C.-B.)

G. van Aggelen
Ministère de l'Environnement de la Colombie-Britannique
North Vancouver (C.-B.)

Annexe B

Adresses de l'Administration centrale et des bureaux régionaux de Conservation et Protection

Administration centrale
351, boulevard Saint-Joseph
Place Vincent-Massey
Hull (Québec)
K1A 0H3

Région de l'Atlantique*
15e étage, Queen Square
45, promenade Alderney
Dartmouth (Nouvelle-Écosse)
B2Y 2N6

Région du Québec
1141, route de l'Église
C.P. 10100
Sainte-Foy (Québec)
G1V 4H5

Région de l'Ontario
25, avenue St. Clair est, 6e étage
Toronto (Ontario)
M4T 1M2

Région de l'Ouest et du Nord
Twin Atria no 2, pièce 210
4999, 98e avenue
Edmonton (Alberta)
T6B 2X3

Région du Pacifique et du Yukon
224, rue Esplanade
North Vancouver (Colombie-Britannique)
V7M 3J7

* On peut se procurer les programmes statistiques TOXSTAT et BOOTSTRP en s'adressant à la Division des services de laboratoire et en faisant parvenir une disquette formatée à l'adresse indiquée.

Annexe C

Examen des différentes méthodes employées par des chercheurs dans les essais antérieurs de fécondation chez les oursins et les clypéasters

L'étude se fonde sur les documents dont disposaient les auteurs en mars 1992. On a omis les éléments suivants des méthodes, parce qu'ils sont communs à tous les essais ou parce qu'ils pourraient facilement être adaptés à toutes les méthodes examinées ci-après.

- **Essais statiques** - Tout le processus d'exposition et de fécondation a été réalisé dans de petits récipients, sans renouvellement des solutions.

- **Substance à expérimenter** - Toutes les méthodes conviendraient à l'essai de produits chimiques à l'état pur, de préparations, d'eaux résiduaires ou d'échantillons d'eau de mer, en ajustant la salinité, une pratique courante dans les méthodes examinées.

- **Résultats** - Le résultat habituel est l'inhibition de la fécondation par rapport au témoin. Toutes les méthodes semblent convenir à l'estimation de la CI_p et de la CSEO/CMEO au moyen des techniques statistiques courantes.

La liste suivante énumère les auteurs ou les organismes responsables.

Beak, 1988. Société d'experts-conseils du Canada qui figure dans les références.

EVS, 1989. Société d'experts-conseils du Canada qui figure dans les références.

ME C.-B., 1990. Ministère de l'Environnement de la Colombie-Britannique, qui comprend van Aggelen, 1988.

GITA, 1991. Comprend cette source et Jonczyk *et al.*, 1991.

Dinnel *et al.*, 1987. Avec ses collaborateurs, Dinnel constitue une école ou une approche importante pour les essais portant sur des échinides.

EPA, 1988. Traité méthodologique publié par le bureau de Cincinnati de l'EPA.

ASTM, 1990. Sous-comité chargé d'élaborer une méthode normalisée. Présidé par G. A. Chapman.

NCASI, 1991 et 1992. Groupe de chercheurs parrainé par l'industrie des pâtes et papiers qui figure dans les références.

EPA (Pac. 91). Figure dans la bibliographie sous la rubrique «Chapman, 1991». Méthode élaborée sur la côte du Pacifique aux fins des comparaisons interlaboratoires, qui a inspiré des documents d'experts-conseils des États-Unis (*c.f.* ci-après).

EPA (Pac. 92). Figure dans la bibliographie sous la rubrique «Chapman, 1992». Méthode provisoire de l'EPA, élaborée sur la côte du Pacifique.

Kobayashi, 1971. Présente les premières méthodes employées par ce chercheur prolifique.

Kobayashi, 1984. Présente les méthodes ultérieures employées par ce chercheur.

S. Calif. Project. Organisme régional de recherches sur la pollution qui figure dans les références sous la rubrique «Oshida *et al.*, 1981».

Nacci *et al.*, 1986. Publication citée par d'autres auteurs comme source de méthodes.

Cherr *et al.*, 1987. Auteurs pour le Bodega Marine Laboratory

BML, 1990. Il s'agit du *Bodega Marine Laboratory* de l'Université de Californie, qui figure dans les références.

ERCEES, 1990. Société d'experts-conseils de Californie, qui figure dans les références.

MECAS, 1990. Société d'experts-conseils de Californie, qui figure dans les références.

NWAS, 1990. Société d'experts-conseils de la côte ouest des États-Unis, qui figure dans les références.

L'ordre de présentation de l'information est le suivant : 1) les laboratoires au Canada; 2) les comités, les organismes gouvernementaux, les laboratoires et les établissements d'enseignement aux États-Unis; 3) les sociétés d'experts-conseils et les principaux auteurs. On a négligé les méthodes détaillées de Pagano et de ses collaborateurs parce que leur description n'était pas conforme aux exigences.

Abréviations paraissant dans les tableaux de la présente annexe :
C. = oursins plats et clypéasters
eau c/d = eau de contrôle/de dilution
NI = non indiqué
O. = oursins

Tableau C.1 Espèces et disponibilité des adultes

Document	Espèces et information sur l'endroit, le prélèvement et la saison de reproduction
Beak, 1988	*Lytechinus pictus*, oursin de Californie; achat; reproduction toute l'année.
	Strongylocentrotus droebachiensis, oursin vert; côtes atlantique, pacifique et arctique du Canada; reproduction vraisemblable de mars à avril.
EVS, 1989	S. *purpuratus*, oursin violet du Pacifique; prélèvement dans des lieux propres ou achat; reproduction de décembre à mars.
	S. droebachiensis, comme ci-dessus.
	S. franciscanus, oursin rouge; océan Pacifique; production en avril et en mai.
	Dendraster excentricus, clypéaster excentrique du Pacifique; selon cette source, reproduction à la fin du printemps et en été.
ME C.-B., 1990	*D. excentricus*, clypéaster excentrique; comme ci-dessus, mais la reproduction se produirait de juin à novembre.
GITA, 1991	*S. droebachiensis*, comme ci-dessus, mais la reproduction se produit de février à mars ou avril.
	L. pictus, comme ci-dessus.
Dinnel *et al.*, 1987	*S. purpuratus*, gravide de décembre à mars, mais plus longtemps en laboratoire.
	S. droebachiensis, comme ci-dessus, gravide de janvier à avril, mais plus longtemps en laboratoire.
	S. franciscanus, comme ci-dessus.
	D. excentricus, comme ci-dessus; gravide de mai à octobre.
EPA, 1988	*Arbacia punctulata*, oursin violet de l'Atlantique; peut être acheté.
ASTM, 1990	*A. punctulata*, comme ci-dessus.
	D. excentricus, comme ci-dessus.
	S. purpuratus, comme ci-dessus.
	S. droebachiensis, comme ci-dessus; d'autres espèces peuvent être utilisées, s'il y a lieu.
NCASI, 1991 et 1992	*D. excentricus*, comme ci-dessus; reproduction toute l'année, sauf de la fin décembre à la fin janvier, en modifiant les conditions de garde en laboratoire.
	S. purpuratus, reproduction de janvier à juin en laboratoire.
	S. droebachiensis, comme ci-dessus; aussi de janvier à juin en laboratoire.
EPA (Pac. 91)	*S. droebachiensis*, comme ci-dessus.
EPA (Pac. 92)	*S. purpuratus*, comme ci-dessus.
Kobayashi, 1971	*Hemicentrotus pulcherrimus*, un oursin du Japon; reproduction de janvier à mars.
	Anthocidaris crassispina, un oursin du Japon; reproduction de mai à août.
	Temnopleurus toreumaticus, un oursin du Japon; reproduction de juillet à octobre.
	Pseudocentrotus depressus, un oursin du Japon; reproduction d'octobre à novembre
Kobayashi, 1984	Identique à Kobayashi, 1971, sauf pour l'espèce non mentionnée *T. toreumaticus*.
S. Calif. Project	*S. purpuratus*, comme ci-dessus; prélèvement à la main.
Nacci *et al.*, 1980	*A. punctulata*, comme ci-dessus.
Cherr *et al.*, 1987	*S. purpuratus*, comme ci-dessus.
BML, 1991	*S. purpuratus*, comme ci-dessus.
ERCEES, 1990	*S. purpuratus*, comme ci-dessus; prélèvement ou achat.
	A. punctulata, comme ci-dessus; prélèvement ou achat.
	Lytechinus sp., comme ci-dessus; prélèvement ou achat.
	D. excentricus, comme ci-dessus; prélèvement ou achat.
MECAS, 1990	NI
NWAS, 1990	*S. purpuratus*, comme ci-dessus.
	D. excentricus, comme ci-dessus; achat, selon les besoins.

Tableau C.2 Garde des adultes en laboratoire

Document	Durée	Eau	Alimentation
Beak, 1988	5 d	Eau de mer reconstituée	Laitue romaine? O. : macroalgues
EVS, 1989	≤ 9 sem	Eau de mer courante à raison de 0,1 L/min par plateau peu profond ou statique et remplacée mensuellement	O. : macroalgues brunes C. : zostère
ME C.-B., 1990	NI	Eau de mer courante non filtrée	C. : non alimentés
GITA, 1991	≥ 7 d	O. verts : eau de mer courante O. blancs: eau de mer reconstituée	O. verts : macroalgues brunes O. blancs : laitue romaine
Dinnel *et al.*, 1987	NI	Eau de mer courante filtrée, recirculation avec filtre	O. : macroalgues C. : plancton et détritus
EPA, 1988	NI	Eau de mer filtrée, 5 L/min pour un réservoir de 20 L contenant 20 adultes ou eau de mer reconstituée et recirculée	O. : laminaire ou laitue romaine
ASTM, 1990	NI	Eau de mer reconstituée ou eau de mer non filtrée	O. : macroalgues et laitue romaine C. : microalgues
NCASI, 1991 et 1992	NI	Eau de mer non filtrée, de 1 à 2 L/min pour un réservoir de 160 L	C. : algues cultivées et nourriture en flocons O. : macroalgues et laitue romaine
EPA (Pac. 91)	NI	NI	NI
EPA (Pac. 92)	NI	Eau de mer filtrée, 5 L/min ou eau de mer reconstituée et recirculée	Laminaire ou laitue romaine
Kobayashi, 1971	≤ 2 d	NI	NI
Kobayashi, 1984	≤ 2 d	NI	NI
S. Calif. Project	NI	Eau de mer recirculée	Algues brunes
Nacci *et al.*, 1986	NI	NI	NI
Cherr *et al.*, 1987	NI	Eau de mer courante	Macroalgues
BML, 1991	NI	NI	NI
ERCEES, 1990	NI	Eau de mer remplacée chaque semaine	Macrocystis
MECAS, 1990	de 0 à 2 d	Eau de mer courante	NI
NWAS, 1990	d/mois	Eau de mer courante ou partiellement recirculée	O. : laminaire ou laitue C. : plancton et détritus

Tableau C.3 Conditions de garde des adultes

Document	Espèces	Température (°C)	Salinité (g/kg)	Oxygène (% sat.)	Éclairage
Beak, 1988	*Lytechinus anamesus*	15	30	NI	NI
EVS, 1989	Différentes espèces d'O.	10	28	Pierre de barbotage	Obscurité constante
	D. excentricus	15	"	"	Photopériode
ME C.-B., 1990		NI	27 à 30	NI	NI
GITA, 1991	*S. droebachiensis*	9	30	NI	NI
	L. pictus	15	"	"	"
Dinnel *et al.*, 1987	*Strongylocentrotus*	Naturelle			
	D. excentricus	De saison	≥ 27	NI	NI
EPA, 1988	*A. punctulata*	15 ± 3	30	NI	NI
ASTM, 1990	*Strongylocentrotus*	8 à 10	25 à 35	de 50 à 100 %	NI
	D. excentricus	12 à 14	"	"	NI
	A. punctulata	15	"	"	Éclairage intense
NCASI, 1991 et 1992	*Strongylocentrotus*	7 à 14	NI	NI	Éclairage
	D. excentricus				ambiant
EPA (Pac. 91)	*S. purpuratus*	NI	NI	NI	NI
EPA (Pac. 92)	*S. purpuratus*	12 (10 à 14)	> 30 (idéalement 32)	NI	NI
Kobayashi, 1971		NI	NI	NI	NI
Kobayashi, 1984		NI	NI	NI	NI
S. Calif. Project	*S. purpuratus*	12	NI	NI	NI
Nacci *et al.*, 1986		NI	NI	NI	NI
Cherr *et al.*, 1987		NI	NI	NI	NI
BML, 1991		NI	NI	NI	NI
ERCEES, 1990		NI	NI	NI	NI
MECAS, 1990		12	NI	NI	NI
NWAS, 1990	*S. purpuratus*	10 ± 2	≥ 25	NI	12 h clarté
	D. excentricus				12 h obsc.

Tableau C.4 Eau de contrôle/de dilution

Document	Eau et traitement recommandés
Beak, 1988	Eau désionisée et sels marins.
EVS, 1989	Eau de mer propre, filtrée à 1 µm; stérilisation aux UV facultative.
ME C.-B., 1990	Eau de mer.
GITA, 1991	Eau désionisée et sels marins ou eau de mer filtrée à 0,45 µm.
Dinnel *et al.*, 1987	Eau de mer filtrée à 5 µm; charbon activé facultatif ou recirculation avec filtre.
EPA, 1988	Eau désionisée et sels marins ou saumure; eau de mer comme témoin supplémentaire possible.
ASTM, 1990	Eau reconstituée avec des sels marins ou une préparation, filtrée à 0,45 µm; COT et MES ≤ 5 mg/L; stérilisation aux UV lorsque des pathogènes sont probables; taux de fécondation requis de 70 % lorsque les spermatozoïdes sont gardés dans l'eau pendant 1 h.
NCASI, 1991 et 1992	Eau de mer filtrée à 1 µm, stérilisée aux UV, aérée et conservée 0 h.
EPA (Pac. 91)	Eau de mer filtrée à 1 µm.
EPA (Pac. 92)	Eau de mer ou reconstituée, de préférence avec de la saumure.
Kobayashi, 1971	NI; probablement de l'eau de mer.
Kobayashi, 1984	NI; probablement de l'eau de mer.
S. Calif. Project	NI
Nacci *et al.*, 1986	Saumure préparée avec de l'eau de mer et diluée avec de l'eau distillée pour obtenir une salinité de 30 g/kg.
Cherr *et al.*, 1987	Eau de mer filtrée à 0,45 µm.
BML, 1991	Eau de mer filtrée et stérilisée aux UV.
ERCEES, 1990	Eau de mer renouvelée chaque semaine et filtrée à 20 µm et 5 µm.
MECAS, 1990	Eau de mer filtrée à 0,45 µm.
NWAS, 1990	Eau de mer non filtrée, ajustée avec de l'eau désionisée pour obtenir une salinité de 32 g/kg.

Tableau C.5 Température et salinité pendant l'essai

Document	Température (°C)	Salinité (g/kg) et méthode d'ajustement
Beak, 1988	20 ± 1	30 ± 2
EVS, 1989	15	Ajustée avec des sels jusqu'à une salinité non mentionnée, lorsque l'essai porte sur des échantillons d'eau de mer; non ajustée lorsque l'essai porte sur des échantillons d'eau douce.
ME C.-B., 1990	10	NI
GITA, 1991	20 ± 1	30 ± 2
Dinnel *et al.*, 1987	O. : 8 à 10 C. : 12 à 16	30 ± 3; ajustée avec du sel marin ou de l'eau désionisée.
EPA, 1988	20 ± 1	30 ± 2; ajustée selon les besoins lorsque l'essai porte sur des effluents
ASTM, 1990	12, mais 20 pour *A. punctulata* et ≤ 2 °C d'écart entre les récipients	> 25 et < 32, à 1 g/kg près du témoin; salinité recommandée de 30; ajustée avec de la saumure ou du sel.
NCASI, 1991 et 1992	12	30; les solutions d'essai sont ajustées avec de la saumure ou du sel.
EPA (Pac. 91)	12	32 ± 1
EPA (Pac. 92)	12 ± 1	32 ± 2; les échantillons sont ajustés à 32.
Kobayashi, 1971	NI	NI; les échantillons de faible salinité sont ajustés avec de la saumure ou par ébullition.
Kobayashi, 1984	NI	NI
S. Calif. Project	NI	NI; apparemment non ajustée; salinité de 31 à 32,6 pour certains essais.
Nacci *et al.*, 1986	NI	NI
Cherr *et al.*, 1987	NI	NI
BML, 1991	15	32; salinité des échantillons et de l'eau ajusté, s'il y a lieu.
ERCEES, 1990	«Appropriée»	NI; ajustée, s'il y a lieu, avec de la saumure ou de l'eau désionisée.
MECAS, 1990	12 ± 1	30 ± 2; salinité des solutions d'essai ajustée avec de la saumure ou de l'eau de source.
NWAS, 1990	12 ± 1	32 ± 2; salinité des échantillons ajustée, selon les besoins, avec de la saumure.

Tableau C.6 Oxygène dissous et éclairage pendant l'essai

Document	OD au début (% de saturation) et ajustement	Éclairage
Beak, 1988	NI	Éclairage normal du laboratoire, flux nominal de 1 100 lx
EVS, 1989	Aération suffisante pour obtenir le niveau acceptable d'OD	NI
ME C.-B., 1990	NI	NI
GITA, 1991	NI	Éclairage normal du laboratoire, flux nominal de 1 100 lx
Dinnel *et al.*, 1987	NI	NI
EPA, 1988	NI	Éclairage normal du laboratoire, entre 540 et 1 080 lx
ASTM, 1990	90 à 100 % dans l'eau c/d	NI
NCASI, 1991 et 1992	NI	Éclairage normal du laboratoire, au moyen de fluorescents
EPA (Pac. 91)	NI	NI
EPA (Pac. 92)	NI	Éclairage normal du laboratoire, entre 540 et 1 100 lx
Kobayashi, 1971 et 1984	NI	NI
S. Calif. Project	Élément non contrôlé	NI
Nacci *et al.*, 1986	NI	NI
Cherr *et al.*, 1987	NI	NI
BML, 1991	NI	NI
ERCEES, 1990	NI	NI
MECAS, 1990	NI	NI
NWAS, 1990	NI	Éclairage normal du laboratoire; aucune photopériode requise

Tableau C.7 Concentration des ions d'hydrogène au début de l'essai

Document	pH de l'eau d'essai, à moins d'indication contraire, et ajustement
Beak, 1988	NI
EVS, 1989	pH de l'échantillon ajusté à 7,5, s'il y a lieu; NI pour le pH de l'eau d'essai
ME C.-B., 1990	NI
GITA, 1991	NI
Dinnel *et al.*, 1987	pH ajusté, s'il y a lieu; niveaux non mentionnés
EPA, 1988	NI
ASTM, 1990	de 7,8 à 8,1 pour l'O. violet du Pacifique et «analogue» pour les autres espèces; pH de l'eau c/d ajusté
NCASI, 1991 et 1992	NI
EPA (Pac. 91)	8,1 ± 0,1 pour l'eau c/d
EPA (Pac. 92)	NI
Kobayashi, 1971 et 1984	NI
S. Calif. Project	Élément non contrôlé; pH moyen de 7,8 à 7,9 dans certains essais
Nacci *et al.*, 1986	NI
Cherr *et al.*, 1987	NI
BML, 1991	8,0; pH de l'échantillon et de l'eau c/d ajusté, s'il y a lieu; stabilisation du pH
ERCEES, 1990	NI
MECAS, 1990	8,0 ± 0,2; pH des solutions d'essai ajusté, s'il y a lieu
NWAS, 1990	8,0

Tableau C.8 Volume d'eau d'essai, description des récipients et nombre de répétitions

Document	Volume (mL)	Récipient	Répétitions
Beak, 1988	5	Flacons à scintillation de 20 mL, jetables	4
EVS, 1989	10	Tubes à essai (16 × 150 mL), avec bouchon	3
ME C.-B., 1990	2	Tubes en verre borosilicaté, jetables	3
GITA, 1991	5	Flacons à scintillation de 20 mL, jetables	3
Dinnel *et al.*, 1987	10	Tubes à essai en verre borosilicaté (16 × 100), jetables et non nettoyés	≥ 3
EPA, 1988	5	Flacons à scintillation de 20 mL, jetables	≥ 3 (habituellement 4)
ASTM, 1990	NI	Flacons en verre de 15 à 22 mL ou autres	4 recommandées (habituellement ≥ 3)
NCASI, 1991 et 1992	2	Tubes à culture en verre borosilicaté (13 × 100), jetables	4
EPA (Pac. 91)	5	Tubes en verre borosilicaté (16 × 100 mm)	3
EPA (Pac 92)	5	Tubes à essai en verre (16 × 100/125 mm), jetables	≥ 3
Kobayashi, 1971	NI	Rince-doigts en verre de 5 cm de diamètre et 3 cm de profondeur	NI
Kobayashi, 1984	NI	Rince-doigts en verre, rempli du produit à expérimenter	NI
S. Calif. Project	50 (spermatozoïdes) 900 (oeufs)	Gobelet en polypropylène Bécher de 1 L	NI NI
Nacci *et al.*, 1986	10	Flacons en verre	NI
Cherr *et al.*, 1987	2	Tubes à culture borosilicatés (13 × 100 mm)	NI
BML, 1991	2	NI	3
ERCEES, 1990	10	Flacons à scintillation de 20 mL	4
MECAS, 1990	5	Flacons à scintillation de 25 mL	≥ 3
NWAS, 1990	10	Tubes à culture borosilicatés (18 × 150 mm)	4

Tableau C.9 Exposition des spermatozoïdes, exposition des spermatozoïdes et des oeufs et témoins expérimentaux

Document	Exposition des spermatozoïdes	Exposition des spermatozoïdes et des oeufs	Récipients de contrôle
Beak, 1988	60 min	60 min	4 d'eau c/d
EVS, 1989	O. : 30 min C. : 60 min	20 min 20 min	3 d'eau c/d; échantillons d'eau douce et témoins en double de salinité préparés avec de l'eau distillée; concentrations identiques aux concentrations de l'échantillon
ME C.-B., 1990	10 min	10 min	3 d'eau de mer
GITA, 1991	60 min	20 min	3 d'eau c/d
Dinnel *et al.*, 1987	60 min	20 min	≥ 3 d'eau c/d
EPA, 1988	60 min	20 min	≥ 3 d'eau c/d (habituellement 4)
ASTM, 1990	60 min	20 min	Eau c/d; témoin de solvant, le cas échéant
NCASI, 1991 et 1992	10 min	10 min	4 d'eau c/d
EPA (Pac. 91)	20 et 60 min	20 et 60 min	Différents témoins pour évaluer les différentes méthodes à expérimenter dans cette étude comparative
EPA (Pac. 92)	60 min	20 min	≥ 3 d'eau c/d; oeufs non fécondés dans l'eau c/d et à concentration élevée; témoins facultatifs d'eau de mer et de milieu récepteur; témoins de salinité lorsque les échantillons sont d'une salinité inférieure à 30 g/kg ou supérieure à 34 g/kg
Kobayashi, 1971	Aucune exposition; les spermatozoïdes et les oeufs sont soumis ensemble à une exposition de fécondation de 3 min.		Oui; on suppose qu'il s'agit de témoins d'eau c/d
Kobayashi, 1984	NI; on suppose que les spermatozoïdes et les oeufs sont soumis ensemble à une exposition de fécondation de 3 min, sinon, dans le cas de gamètes «âgés», l'exposition préalable des spermatozoïdes à la solution d'essai dure 5 min et l'exposition préalable des oeufs dure plusieurs heures.		NI
S. Calif. Project	15 min	Exposition préalable des oeufs pendant 30 min, puis 15 min avec les spermatozoïdes	4 d'eau de mer et des témoins de salinité qui correspondent aux concentrations d'effluent
Nacci *et al.*, 1986	60 min	20 min	NI
Cherr *et al.*, 1987	10 min	10 min	Oui; détails non mentionnés
BML, 1991	10 min	10 min	NI; on suppose qu'il s'agit de témoins d'eau c/d
ERCEES, 1990	60 min	20 min	NI; vraisemblablement, 4 témoins d'eau c/d
MECAS, 1990	NI	NI	≥ 3 d'eau de mer
NWAS, 1990	60 min	20 min	4 d'eau c/d

Tableau C.10 Stimulation de la reproduction et prélèvement des gamètes

Document	Stimulus	Prélèvement
Beak, 1988	0,5 mL (d'une solution) de KCl de 0,5 *M*	5 mm d'eau de mer dans des boîtes de Petri
EVS, 1989	0,5 mL de KCL de 0,5 *M* et deuxième injection, s'il y a lieu	Eau c/d dans un bécher de 150 mL
ME C.-B., 1990	O. : 1,0 mL de KCl de 0,5 *M*; C. : 0,5 mL de KCl de 0,5 *M*	Comme ci-dessus; eau de mer à 10 °C dans un bécher de 250 mL
GITA, 1991	0,5 mL de KCl de 0,5 *M*	5 mm d'eau de mer dans des boîtes de Petri
Dinnel *et al.*, 1987	O. : 1,0 mL de KCl de 0,5 *M* ; C. : 0,5 mL de KCl de 0,5 *M*	Eau de mer dans un bécher de 100 mL
EPA, 1988	12 volts C.C. pendant 30 s	Bol contenant de l'eau c/d peu profonde et seringue
ASTM, 1990	Pour la plupart des espèces, 0,5 de 1,0 mL de KCl de 0,5 *M* et une deuxième injection après 10 min s'il n'y a pas reproduction; pour *A. punctulata*, 12 volts C.C.	Eau de mer dans un petit bécher
NCASI, 1991 et 1992	O. : 1,0 mL de KCl de 0,5 *M*; C. : 0,5 mL de KCl de 0,5 *M*	Prélèvement avec une pipette et dépôt dans des tubes à 12 °C; eau c/d dans un bécher de 50 mL (O. : bécher de 100 mL)
EPA (Pac. 91)	0,5 à 1,0 mL de KCl de 0,5 *M* et deuxième injection, s'il y a lieu	Eau c/d dans un bécher de 100 mL
EPA (Pac. 92)	0,5 mL de KCl de 0,5 *M* et deuxième injection, s'il y a lieu	Pour les oeufs, eau c/d dans un bécher de 100 mL; semen prélevé à sec
Kobayashi, 1971	Injection de KCl pour les ♀	Gonades enlevées; sperme prélevé à sec exposé à l'eau de mer
Kobayashi, 1984	«Méthode du KCl»	NI
S. Calif. Project	0,5 mL de KCl de 0,5 *M*	Pour les oeufs, eau de mer, dans un bécher de 100 mL; semen prélevé à sec avec une pipette et déposé dans des tubes maintenus à <5 °C
Nacci *et al.*, 1986	Électricité	NI
Cherr *et al.*, 1987	0,5 mL de KCl de 0,5 *M*	Milieu humide (♂); prélèvement avec une pipette et dépôt dans des flacons sur glace
BML, 1991	0,5 à 1,0 mL de KCl de 0,5 *M*	Eau de mer dans un bécher de 50 mL
ERCEES, 1990	0,5 mL de KCl de 0,5 *M*	Agitation et dépôt dans un rince-doigts avec de l'eau de mer (♀) ou dans un petit bécher; prélèvement à sec du sperme et dans l'eau pour les oeufs
MECAS, 1990	0,5 mL de KCl de 0,5 *M* et deuxième injection après 5 min, s'il y a lieu	Pour les oeufs, dépôt dans un bécher de 100 mL avec 20 mL d'eau; prélèvement à sec du sperme avec une seringue et dépôt dans un flacon sur la glace
NWAS, 1990	O. : 1,0 mL de KCl de 0,5 *M*; C. : 0,5 mL de KCl de 0,5 *M*	Dans un bécher vide de 100 mL, prélèvement des oeufs et dépôt dans l'eau c/d froide; prélèvement à sec du semen avec une pipette et dépôt dans un tube à essai refroidi

Tableau C.11 Garde des gamètes

Document	Conditions et restrictions
Beak, 1988	Sperme composite provenant de plusieurs mâles.
EVS, 1989	O. : garde du sperme sur la glace; lavage des oeufs à trois reprises; mélange des gamètes ♂ et ♀ .
ME C.-B., 1990	Sperme composite de ≥ 2 mâles; utilisé dans ≤ 4 h; stockage des oeufs pendant ≤ 24 h.
GITA, 1991	Sperme composite, gardé sur glace et utilisé dans ≤ 20 min; oeufs provenant de quatre sujets.
Dinnel *et al.*, 1987	L'activation du sperme pendant ≤ 1,5 h n'a pas affecté l'essai; lavage des oeufs à trois reprises; combinaison facultative.
EPA, 1988	Sperme utilisé en < 1 h, gardé sur glace; oeufs gardés pendant plusieurs heures à la température ambiante.
ASTM, 1990	Sperme conservé pendant plusieurs heures dans l'eau de mer fraîche; se conserve «au sec» et au froid de nombreuses heures; rinçage des oeufs à deux ou trois reprises; sperme conservé dans des récipients distincts, utiliser le test des cubes pour l'essai et la combinaison.
NCASI, 1991 et 1992	Sperme utilisé en ≤ 1 h; oeufs, normalement en ≤ 2 h; garde à 12 °C.
EPA (Pac. 91)	Prélèvement ≤ 30 min; lavage des oeufs à deux reprises; combinaison.
EPA (Pac. 92)	Prélèvement ≤ 30 min; lavage des oeufs à deux reprises; garde dans l'eau à concentration normalisée; garde du sperme dans des flacons distincts sur glace et utilisation dans ≤ 4 h.
Kobayashi, 1971	Utilisation en ≤ 1 h.
Kobayashi, 1984	Utilisation des gamètes en ≤ 1h; lavage des oeufs à plusieurs reprises.
S. Calif. Project	Sperme prélevé à sec gardé à < 5 °C; mélange des oeufs de six ♀ ; lavage à deux reprises.
Nacci *et al.*, 1986	NI
Cherr *et al.*, 1987	Garde des gamètes sur la glace pendant ≤ 2 h.
BML, 1991	Oeufs et sperme prélevé à sec gardés dans des flacons sur glace; lavage des oeufs à deux reprises.
ERCEES, 1990	Mélange du sperme et des oeufs.
MECAS, 1990	Garde du sperme prélevé à sec dans des flacons sur la glace; lavage des oeufs à deux reprises; garde dans l'obscurité à 12 °C.
NWAS, 1990	Garde du semen prélevé à sec dans des tubes réfrigérés; lavage des oeufs à deux reprises et utilisation des oeufs frais.

Tableau C.12 Nombre de gamètes par récipient et rapport spermatozoïdes:oeuf

Document	Spermatozoïdes par récipient	Oeufs par récipient	Rapport spermatozoïdes:oeuf
Beak, 1988	7 ou 5 millions?	2 000	2 500:1 ou 3 500:1?
EVS, 1989	O. : 4 millions C. : 2,4 millions	2 000 2 000	2 000:1 1 200:1
ME C.-B., 1990	NI	500	NI
GITA, 1991	~5 millions	2 000	~ 2 500:1
Dinnel *et al.*, 1987	Quantités variables	2 000	Déterminer le rapport approprié; habituellement 200:1 pour l'O. *S. purpuratus* 1 000:1 pour l'O. rouge, 2 000:1 pour l'O. vert, 1 200:1 pour le C. (*D. excentricus*).
EPA, 1988	5 millions	2 000	2 500:1
ASTM, 1990	Quantité empirique pour obtenir un taux de fécondation de 70 à 90 %	200/mL de solution d'essai	Habituellement 200:1 pour l'O. *S. purpuratus*, 1 200:1 pour le C. et 2 000 à 2 500:1 pour les autres espèces.
NCASI, 1991 et 1992	C. : de 20 000 à 60 000 O. : quantité empirique	500 500	40:1 à 120:1 Déterminer le rapport approprié.
EPA (Pac. 91)	Quantités variables	1 120?	Différents rapports pour comparer différentes méthodes.
EPA (Pac. 92)	560 000	1 120	500:1 (rapport fixe)
Kobayashi, 1971	NI	NI	NI
Kobayashi, 1984	NI	NI	NI
S. Calif. Project	NI (1,2 mL de préparation-étalon)	31 500	NI
Nacci *et al.*, 1986	0,1 million	1 000	100:1 (1 000:1, selon les auteurs)
Cherr *et al.*, 1987	0,5 million	500	1 000:1
BML, 1991	NI (0,1 mL «sec»)	NI (0,1 mL)	1 000:1
ERCEES, 1990	Quantité empirique	2 000	Déterminer le rapport approprié.
MECAS, 1990	1 million?	Quantité empirique	Déterminer le rapport approprié pour obtenir un taux de fécondation de 70 à 90 %.
NWAS, 1990	Quantité empirique	2 000	Déterminer le rapport approprié pour obtenir un taux de fécondation de 70 à 90 %; habituellement, les rapports jouent entre 200:1 et 2 000:1.

Tableau C.13 Correction des résultats en fonction du degré de fécondation chez les témoins

Document	Méthode d'ajustement*
Beak, 1988	Formule d'Abbott
EVS, 1989	Formule d'Abbott
ME C.-B., 1990	Formule d'Abbott
GITA, 1991	Formule d'Abbott : $A = (O - T) \cdot (100)/(100 - T)$**
Dinnel *et al.*, 1987	Formule d'Abbott
EPA, 1988	Formule d'Abbott
ASTM, 1990	Formule «taux ajusté de fécondation» : $AF = 100 \cdot OF/TF$ ** (Les symboles ont changé, mais cette formule donne le même résultat que la formule d'Abbott, calculée cette fois pour la fécondation.)
NCASI, 1991 et 1992	NI
EPA (Pac. 91)	NI
EPA (Pac. 92)	Comme pour EPA, 1988
Kobayashi, 1971	NI
Kobayashi, 1984	NI
S. Calif. Project	La CI_{50} n'est pas mentionnée comme étant une statistique à évaluer.
Nacci *et al.*, 1986	NI
Cherr *et al.*, 1987	«Normalisée» pour les fécondations de contrôle; méthode non indiquée.
BML, 1991	NI
ERCEES, 1990	NI
MECAS, 1990	NI
NWAS, 1990	Formule d'Abbott

* Les méthodes d'ajustement susmentionnées ne permettent pas d'évaluer la CSEO/CMEO. Pour ces calculs, on utilise les valeurs non modifiées (brutes) du taux de fécondation. Les méthodes d'ajustement mentionnées produisent les équivalents numériques du pourcentage de diminution de la fécondation, calculé dans le présent document (*cf.* 4.5.3) comme résultat préliminaire pour l'estimation d'une CI_p.

** A = Taux ajusté d'oeufs non fécondés, pour exposition dans un récipient d'essai donné.
O = Taux observé d'oeufs non fécondés, pour exposition dans un récipient d'essai donné.
T = Taux témoin d'oeufs non fécondés dans de l'eau de contrôle/de dilution .
AF = Taux ajusté d'oeufs **fécondés** dans un récipient d'essai donné.
OF = Taux observé d'oeufs **fécondés** dans un récipient d'essai donné.
CF = Taux témoin d'oeufs **fécondés** dans de l'eau de contrôle/de dilution.

Tableau C.14 Exigences de validité

Document	Taux de fécondation dans les solutions de contrôle (%)	Autres exigences
Beak, 1988	NI	
EVS, 1989	NI	
ME C.-B., 1990	NI	
GITA, 1991	NI	
Dinnel *et al.*, 1987	≥ 50	
EPA, 1988	≥ 70 (un taux > 90 pourrait masquer la toxicité)	
ASTM, 1990	≥ 50 (taux souhaitable de 70 à 90; taux idéal de 80 à 95)	
NCASI, 1991 et 1992	Taux acceptable de 50 à 100; taux idéal de 50 à 90	
EPA (Pac. 91)	Taux souhaitable de 80 à 95	
EPA (Pac. 92)	Taux de fécondation ≥ 50 dans la solution de contrôle; la concentration des spermatozoïdes ne doit pas être plus de deux fois supérieure ou inférieure à la concentration désirée; essentiellement, fécondation nulle dans les témoins contenant uniquement des oeufs (eau c/d et effluent)	
Kobayashi, 1971	NI	
Kobayashi, 1984	Vérification préalable à l'essai : ≥ 85 (gamètes âgés : ≥ 91)	La membrane doit se soulever dans les 3 min qui suivent la fécondation
S. Calif. Project	NI	
Nacci *et al.*, 1986	≥ 60, ≤ 90	
Cherr *et al.*, 1987	NI	
BML, 1991	NI	
ERCEES, 1990	≥ 70, ≤ 90	Courbe dose-effet positive et logique; l'essai a satisfait aux exigences physiques et chimiques
MECAS, 1990	NI	
NWAS, 1990NI	≥ 70, ≤ 90	

Tableau C.15 Produits toxiques de référence

Document	Produit chimique	Exigé?	Type d'essai ou résultat*
Beak, 1988	NI		
EVS, 1989	Dodécyl sulfate de sodium	Oui	Dans les essais de répétition, cinq concentrations de 1,0 à 10 mg/L
ME C.-B., 1990	NI		
GITA, 1991	Chlorure de cadmium	Non	
Dinnel *et al.*, 1987	Argent	Non	
EPA, 1988	Sulfate de cuivre	Oui	Pour chaque lot de gamètes
ASTM, 1990	NI	Non	«Pourrait mesurer la sensibilité d'une ponte»
NCASI, 1991 et 1992	NI		
EPA (Pac. 91)	Cuivre	Non?	
EPA (Pac. 92)	Cuivre, dodécyl sulfate de sodium ou autres produits de référence	Oui	Dans chaque série d'essais
Kobayashi, 1971	NI		
Kobayashi, 1984	NI		
S. Calif. Project	NI		
Nacci *et al.*, 1986	NI		
Cherr *et al.*, 1987	Azoture de sodium	Non	
BML, 1991	NI		
ERCEES, 1990	NI		
MECAS, 1990	NI		
NWAS, 1990	Azoture de sodium	Oui	En parallèle avec l'essai principal

* Sauf indication contraire, l'essai est un essai classique utilisant les résultats de l'essai proprement dit et comprenant une estimation de la CI_p et de la CSEO/CMEO.

Annexe D

Bibliographie. Documents supplémentaires se rapportant directement à l'essai canadien sur la fécondation chez les échinides

La présente liste pourrait être utile aux laboratoires qui désirent consulter une plus vaste gamme d'ouvrages relatifs aux essais sur les échinides. Beaucoup de ces documents contiennent des données sur les concentrations de divers polluants qui sont toxiques pour les gamètes d'échinides ou comparent les résultats sur d'autres stades de développement ou d'autres organismes. Certaines notes ont été ajoutées entre crochets.

Adams, J.A., «Effect of PCB (Aroclor 1254) on Early Development and Mortality in *Arbacia* Eggs», *Water Air Soil Pollut., 20(1):* 1-6, 1983.

Allen, H., «Effects of Petroleum Fractions on the Early Development of a Sea Urchin», *Mar. Pollut. Bull. 2:* 138-140 [développement embryonnaire plus sensible que la fertilisation], 1971.

ASTM (American Society for Testing and Materials), «Proposed Standard EXXX for Conducting Static Acute Toxicity Tests with Echinoid Embryos» Draft no. 1, ASTM Subcommittee of E-47.01 on Aquatic Toxicology, American Society for Testing and Materials, Philadelphie, PA [prés. : P.A. Dinnel, Ph. D., Fisheries Res. Inst., Univ. Washington, Seattle, Washington] [l'essai porte sur le développement embryonnaire de 48 à 96 h], 1991, 42 p.

ASZ, «Developmental Biology of the Echinoderms. A Symposium», *Amer. Zool., 15*(3): 485-775, 1975.

Bay, S.M., P.S. Oshida et K.D. Jenkins, «A Simple New Bioassay Based on Echinochrome Synthesis by Larval Sea Urchins», *Mar. Environ. Res., 8:* 29-39, 1982.

Bougis, P., «Effet du cuivre sur la croissance du plutéus d'Oursin *(Paracentrotus lividus)*», *C.R. Acad. Sci. Paris, 260:* 2929-2931 [croissance des embryons], 1965.

Bougis, P., M.C. Corre et M. Étienne, «Sea Urchin Larvae as a Tool for Assessment of the Quality of Sea-water», *Ann. Inst. Océanogr. (Paris), 55*: 21-26, 1979.

Bresch, H., R. Speilhoff, V. Mohr et H. Barkemeyer, «Use of Sea Urchin Egg for Quick Screen Testing of the Biological Activity of Substances. I. Influence of Fractions of a Tobacco Smoke Condensate on Early Development», *Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 141*: 747-752, 1972.

Canevari, G.P. et G.P. Lindblom, «Some Dissenting Remarks on 'Deleterious Effects of Corexit 9527 on Fertilization and Development'», *Mar. Pollut. Bull., 7* (7): 127-128 [fait suite à un article de Lönning et Hagström, 1976, et offre une critique], 1976.

Castagna, A., F. Sinatra, M. Scalia et V. Capodicasa, «Observations of the Effect of Zinc on the Gametes and Various Development Phases of Arbacia lixula», *Mar. Biol., 64:* 285-289 [motilité du sperme réduite en 96 h], 1981.

Ceas, M.P., «Effects of 3,4-Benzopyrene on Sea Urchin Egg Development», *Acta Embryol. Exp., 3:* 267-272, 1974.

de Angelis, E. et G.G. Giordano, «Sea Urchin Egg Development Under the Action of Benzo-*a*-pyrene and 7-12-Dimethylbenz-*a*-anthranacene», *Cancer Res., 34:* 1275-1280, 1974.

den Besten, P.J., H.J. Herwig, D.I. Zandee et P.A. Voogt, «Effects of Cadmium and PCBs on Reproduction of the Sea Star *Asterias rubens*: Aberrations in the Early Development», *Ecotoxicol. Environ. Safety, 18:* 173-180, 1989.

Dinnel, P.A., «Adaptation of the Sperm/Fertilization Bioassay Protocol to Hawaiian Sea Urchin Species», rapport final pour le State of Hawaii Dept. of Health, Marine Biological Consultants of Washington, rapport nº MBCW-8801, 1988, 38 p.

Dinnel, P.A., «Annotated Bibliography of Bioassays Related to Sediment Toxicity Testing in Washington State», rapport final pour l'U.S. Army Corps of Engineers, Seattle, WA, University of Washington, School of Fisheries, rapport nº FRI-UW-9017, 1990.

Dinnel, P.A. et R.M. Kocan, «Puget Sound Estuary Program Sediment Bioassay Comparison Test: Results of the Sand Dollar *(Dendraster excentricus)* Embryo Bioassays», rapport final pour Battelle Laboratories et l'Environmental Protection Agency, Seattle, WA, Marine Biological Consultants of Washington, rapport nº MBCW-8802, 1988, 18 p.

Dinnel, P.A., S.C. Crumley et Q.J. Stober, «Sand Dollar (*Dendraster excentricus*) Sperm and Embryo Bioassay of Puget Sound Receiving Water Samples», rapport final pour le Washington State Shellfish Lab., Brinnon, WA, University of Washington, School of Fisheries, rapport nº FRI-UW-7912 [essais parallèles menés dans deux laboratoires sur le sperme et les embryons de clypéasters et sur les larves d'huitres], 1979, 19 p.

Dinnel, P.A., Q.J. Stober et D.H. DiJulio, «Sea Urchin Sperm Bioassay for Sewage and Chlorinated Seawater and its Relation to Fish Bioassays», *Mar. Environ. Res., 5:* 29-39, 1981.

Dinnel, P.A., Q.J. Stober, J.M. Link, M.W. Letourneau, W.E. Roberts, S.P. Felton et R.E. Nakatani, «Methodology and Validation of a Sperm Cell Toxicity Test for Testing Toxic Substances in Marine Waters», University of Washington, School of Fisheries, rapport nº FRI-UW-8306, 1983, 198 p.

Drouin, G., J.H. Himmelman et P. Béland, «Impact of Tidal Salinity Fluctuations on Echinoderm and Mollusc Populations», *Can. J. Zool., 63:* 1377-1387, 1985.

Ebert T.E., «Growth and Mortality of Post-larval Echinoids», *Amer. Zool., 15*(3): 755-775 [fait partie d'un symposium], 1975.

Epel, D., «The Program of and Mechanisms of Fertilization in the Echinoderm Egg», *Mer. Zool. 15:* 507-522, 1975.

EVS, «An Evaluation of the Sensitivity of Microassays Relative to Trout and Daphnid Acute Lethality Tests», EVS Consultants, North Vancouver (C.-B.), rapport pour le Laboratoire du Centre de technologie environnementale de River Road d'Environnement Canada, Ottawa (Ont.) [brefs commentaires concernant l'essai sur le sperme relativement à d'autres essais rapides], 1989, 76 p.

Ferrari, L., R.J. Lombardo, P. del Giorgio, M.C. Tortorelli et D.A. Hernandez, «Effects of Formulated Ethyl Parathion on Fertilization of the Sea Urchin *Pseudechinus magellanicus* (Philippi)», *Bull. Environ. Contam. Toxicol., 42:* 367-374, 1989.

Guidice, G., «The Sea Urchin Embryo. A Developmental Biological System», Springer-Verlag, Berlin, 1986, 246 p.

Hagström, B.E. et S. Lönning, «The Sea Urchin Egg as a Testing Object in Toxicology», *Acta Pharmacol. Toxicol., 32:*(Suppl. 1): 1-49, 1973.

Hagström, B.E. et S. Lönning, «Deleterious Effects of Corexit 9527 on Fertilization and Development», *Mar. Pollut. Bull., 8:* 136-138, 1977.

Hernández, D.A., R.J. Lombardo, L. Ferrari et M.C. Tortorelli, «Toxicity of Ethyl-parathion and Carbaryl on Early Development of Sea Urchin», *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, *45*: 734-741, 1990.

Heslinga, G.A., «Effects of Copper on the Coral-reef Echinoid *Echinometra mathaei*», *Mar. Biol., 35:* 155-160 [gamètes, embryons et adultes exposés], 1976.

Himmelman, J.H., «Reproductive Cycle of *Strongylocentrotus droebachiensis*», *Can. J. Zool., 56:* 1828-1836, 1978.

Himmelman, J.H., Y. Lavergne, F. Axelsen, A. Cardinal et E. Bourget, «Sea Urchins in the Saint Lawrence Estuary: Their Abundance, Size, Structure and Suitability for Commercial Exploitation», *Can. J. Fish. Aquat. Sci., 40:* 474-486, 1983.

Hinegardner, R.T., «Morphology and Genetics of Sea Urchin Development», *Amer. Zool., 15*(3): 679 -690, 1975.

Hinegardner, R.T. et M.M.R. Tuzzi, «Laboratory Culture of the Sea Urchin *Lytechinus pictus*», p. 291-308 *in: NRC, 1981, Laboratory Animal Management. Marine Invertebrates,* U.S. National Research Council, Inst. Lab. Animal Resources, Committee on Marine Invertebrates, National Academy Press, Washington, DC, 1981.

Hose, J.D., «Potential Uses of Sea Urchin Embryos for Identifying Toxic Chemicals: Description of a Bioassay Incorporating Cytologic, Cytogenetic and Embryologic Endpoints», *J. Appl. Toxicol., 5:* 245-254 [essai sur la croissance d'une durée de 48 h], 1985.

Hose, J.E. et H.W. Puffer, «Cytologic and Cytogenetic Anomalies Induced in Purple Sea Urchin Embryos (*Strongylocentrotus purpuratus* S.) by Parental Exposure to Benzo(*a*)pyrene», *Mar. Biol. Lett., 4:* 87-95, 1983.

Hose, J.E., H.W. Puffer, P.S. Oshida et S.M. Bay, «Development and Cytogenetic Abnormalities Induced in the Purple Sea Urchin by Environmental Levels of Benzo(*a*)pyrene», *Arch. Environ. Contam. Toxicol., 12:* 319-325, 1983.

Jackim, E. et D. Nacci, «A Rapid Aquatic Toxicity Assay Utilizing Labeled Thymidine Incorporation in Sea Urchin Embryos», *Environ. Toxicol. Chem., 3:* 631-636, 1984.

Jackim, E. et D. Nacci, «Improved Sea Urchin DNA-based Embryo Growth Toxicity Test», *Environ. Toxicol. Chem., 5:* 561-565, 1986.

Kinae, N., T. Hashizume, T. Makita, I. Tomita et I. Kimura, «Kraft Pulp Mill Effluent and Sediment Can Retard Development and Lyse Sea Urchin Eggs», *Bull. Environ. Contam. Toxicol., 27:* 616-623, 1981.

Kobayashi, N., «Bioassay Data for Marine Pollution Bioassay Using Sea Urchin Eggs», *Publ. Seto Mar. Biol. Lab., 194*(6): 439-444 [fertilisation (3 min) réussie et croissance larvaire (12 à 36 h)], 1972.

Kobayashi, N., «Studies on the Effects of Some Agents on Fertilized Sea Urchin Eggs, as a Part of the Bases for Marine Pollution Bioassay», *I. Publ. Seto Mar. Biol. Lab., 21*(2): 109-114, 1973.

Kobayashi, N., «Marine Pollution Bioassay by Sea Urchin Eggs, an Attempt to Enhance Accuracy», *Publ. Seto Mar. Biol. Lab., 21*(5/6): 377-391, 1974.

Kobayashi, N., «Bioassay Data for Marine Pollution Using Sea Urchin Eggs, 1975», *Publ. Seto Mar. Biol. Lab., 23*(6): 427-433, 1977.

Kobayashi, N., «Preliminary Experiments with Sea Urchin Pluteus and Metamorphosis in Marine Pollution Bioassay», *Publ. Seto Mar. Biol. Lab., 24*(1/3): 9-21 [clypéaster plus sensible que l'oursin de mer, plutéus encore plus sensible], 1977.

Kobayashi, N., «Comparative Toxicity of Various Chemicals, Oil Extracts and Oil Dispersant Extracts to Canadian and Japanese Sea Urchin Eggs», *Publ. Seto Mar. Biol. Lab., 26*(1/3): 123-133, 1981.

Kobayashi, N., «Marine Pollution Bioassay by Sea Urchin Eggs, an Attempt to Enhance Accuracy, II», *Publ. Seto Mar. Biol. Lab., 30*(4/6): 213-226 [comparaison de diverses combinaisons d'oeufs ou de sperme prétraités qui donne des résultats intéressants], 1985.

Kobayashi, N., «Marine Pollution Bioassay by Sea Urchin Eggs, an Attempt to Enhance Sensitivity», Publ. *Seto Mar. Biol. Lab., 34*(4-6): 225-237, 1990.

Kobayashi, N., H. Nogami et K. Doi, «Marine Pollution Bioassay by Using Sea Urchin Eggs in the Inland Sea of Japan (the Seto-Naikai)», *Publ. Seto Mar. Biol. Lab., 19*(6): 359-381, 1972.

Lee, H.H. et C.H. Xu, «Effects of Metals on Sea Urchin Development: A Rapid Bioassay», *Mar. Pollut. Bull., 15:* 18-21, 1984.

Long, E.R. et M.P. Buchman, «An Evaluation of the Performance of Five Types of Sediment Toxicity Tests», *in: Oceans '89, an International*

Conference Addressing Methods for Understanding the Global Ocean. Vol. 2, Ocean Pollution, du 18 au 21 sept. 1989, Seattle, Washington, Marine Technol. Soc., Washington, DC, et Inst. Electrical Electronic Engineers, Piscataway, N.J. [compare les résultats relatifs à *Strongylocentrotus purpuratus* avec ceux d'autres espèces marines], p. 603-607, 1989.

Long, E.R. et M.F. Buchman, «An Evaluation of Candidate Measures of Biological Effects for the National Status and Trends Program», U.S. Dept. of Commerce, National Oceanic and Atmospheric Administration, Seattle, WA, NOAA Tech. Mem. NOS OMA 45, 1989.

Lönning, S., «The Sea Urchin Egg as a Test Object in Oil Pollution Studies», *Procès-verbal de la réunion du Conseil international pour l'exploration de la mer, 171:* 186-188, 1977.

Lönning, S. et B.E. Hagström, «The Effects of Crude Oils and the Dispersant Corexit 8666 on Sea Urchin Gametes and Embryos», *Norw. J. Zool., 23:* 121-129, 1975.

Lönning, S. et B.E. Hagström, «Deleterious Effects of Corexit 9527 on Fertilization and Development», *Mar. Pollut. Bull., 7* (7): 124-127 [*cf.* Canevari et Lindblom, 1976], 1976.

Nacci, D. et E. Jackim, «Rapid Aquatic Toxicity Assay Using Incorporation of Tritiated-thymidine into Sea Urchin, *Arbacia punctulata*, Embryo: Evaluation of Toxicant Exposure Procedures», *in : Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Eighth Symposium*», R.C. Bahneer et D.J. Hansen (éd.), American Society for Testing and Materials, Philadelphie, PA, ASTM STP No. 891, p. 382-394, 1985.

Nacci, D.E., R. Walsh et E. Jackim, «Guidance Manual for Conducting Sperm Cell Tests with the Sea Urchin, *Arbacia punctulata*, for Use in Testing Complex Effluents», U.S. Environmental Protection Agency, Environ. Res. Lab., Narragansett, R.I. Contribution no. X105, 1985, 34 p.

Nicol, J.A.C., W.H. Donahue, R.T. Wang et K. Winters, «Chemical Composition and Effects of Water Extracts of Petroleum on Eggs of the Sand Dollar *Melitta quinquiesperforata*», *Mar. Biol., 40:* 309-316, 1977.

Oshida, P.S. et T.K. Goochey, «A New Test for Measuring Seawater Toxicity», South Calif. Coastal Water Res. Project Biennial Rept., p. 149-159, 1980.

Ozretic, B. et M. Krajnovic-Ozretic, «Morphological and Biochemical Evidence of the Toxic Effect of Pentachlorophenol on the Developing Embryos of the Sea Urchin», *Aquat. Toxicol., 7:* 255-263, 1985.

Pagano, G., M. Cipollaro, G. Corsale, A. Esposito, G.G. Giordano, E. Ragucci et N.M. Trieff, «Comparative Toxicities of Benzene, Chlorobenzene and Dichlorobenzene to Sea Urchin Embryos and Sperm», *Bull. Environ. Contam. Toxicol., 40:* 481-488, 1988.

Pagano, G., M. Cipollaro, G. Corsale, A. Esposito, A. Mineo, E. Ragucci,

G.G. Giordano, N. Kobayashi et N.M. Trieff, «Effects of Sodium Azide on Sea Urchin Embryos and Gametes», *Teratogen. Carcinogen. Mutagen., 8:* 363-376, 1988.

Pagano, G., M. Cipollaro, G. Corsale, A. Esposito, E. Ragucci, G.G. Giordano et N.M. Trieff, «Comparative Toxicities of Chlorinated Biphenyls on Sea Urchin Egg Fertilisation and Embryogenesis», *Mar. Environ. Res., 17:* 240-244, 1985.

Pagano, G., G. Corsale, A. Esposito, P.A. Dinnel et L.A. Romana, «Use of Sea Urchin Sperm and Embryo Bioassay in Testing the Sublethal Toxicity of Realistic Pollutant Levels», p. 153-163, *in: Carcinogenic, Mutagenic, and Teratogenic Marine Pollutants; Impact on Human Health and the Environment* [publié pour le compte du bureau régional européen de l'Organisation mondiale de la santé et du Programme environnemental des Nations Unies], Gulf Publ. Co., Houston, TX, Advances in Applied Biotechnology Series, vol. 5, [aucun détail sur les méthodes], 1989.

Pagano, G., A. Esposito, P. Bove, M. de Angelis, A. Rota, E. Vamvakinos et G.G. Giordano, «Arsenic-induced Developmental Defects and Mitotic Abnormalities in Sea-urchin Development», *Mutation Res., 104:* 351-354 [sperme préexposé], 1982.

Pagano, G., A. Esposito et G.G. Giordano, «Fertilization and Larval Development in Sea Urchins Following Exposure of Gametes and Embryos to Cadmium», *Arch Environ. Contam. Toxicol., 11:* 47-55, 1982.

Pagano, G., A. Esposito, G.G. Giordano et B.E. Hagström, «Embryotoxic and Teratogenic Effects of Styrene Derivatives on Sea Urchin Development», *Scand. J. Work Environ. & Health, 4* (Suppl. 2): 136-141, 1978.

Pagano, G., A. Esposito, G.G. Giordano, E. Vamvakinos, I. Quinto, G. Bronzetti, C. Bauer, C. Corsi, R. Nieri et A. Ciajolo, «Genotoxicity and Teratogenicity of Diphenyl and Diphenyl Ether: A Study of Sea Urchins, Yeast, and *Salmonella typhimurium*», *Teratogen. Carcinogen. Mutagen. 3:* 377-393, 1983.

Pastorok, R.A. et D.S. Becker, «Comparative Sensitivity of Bioassays for Assessing Sediment Toxicity in Puget Sound», *in: Oceans '89, an International Conference Addressing Methods for Understanding the Global Ocean. Vol. 2, Ocean pollution.*, du 18 au 21 septembre 1989, Seattle, WA, Marine Technol. Soc., Washington, DC et Inst. Electrical Electronic Engineers, Piscataway, NJ, 1989, p. 431-436.

Pastorok, R.A. et D.S. Becker, «Comparative Sensitivity of Sediment Toxicity Bioassays at Three Superfund Sites in Puget Sound», *in: Aquatic Toxicology and Risk Assessment: thirteenth volume,* W.G. Landis et W.H. van der Schalie (éd.), American Society for Testing and Materials, Philadelphie, PA, ASTM STP No. 1096 [*Dendraster*], p. 123-139, 1990.

Pavillon, J.F., «Sea Urchin Eggs and Larvae: Excellent Biological Indicators», *in: Echinoderm Biology, Proc. Sixth Internat. Echinoderm Conf.,*

Aug. 23-28, 1987, Victoria, R.D. Burke, P.V. Mladenov, P. Lambert et R.L. Parsley (éd.), A.A. Balkema, Rotterdam, Pays-Bas [explications et analyses utiles pour l'essai embryo-larvaire], p. 821-825, 1988.

Pearce, J.S., D.J. Eernisse, V.B. Pearse et K.A. Beauchamp, «Photoperiodic Regulation of Gametogenesis in Sea Stars, with Evidence for an Annual Calendar Independent of Fixed Daylength», *Amer. Zool., 26:* 417-431 [technique de maturation des oursins hors-saison], 1986.

Pearce, J.S., V.B. Pearse et K.K. Davis, «Photoperiodic Regulation of Gametogenesis and Growth in the Sea Urchin *Strongylocentrotus purpuratus*» [technique de maturation des oursins hors-saison], *J. Exp. Zool., 27:* 107-118, 1986.

Percy, J.A., «Thermal Adaptation in the Boreo-arctic Echinoid, *Strongylocentrotus droebachiensis* (O.F. Müller, 1776), I. Seasonal Acclimatization of Respiration. II. Seasonal Acclimatization and Urchin Activity. IV. Acclimation in the Laboratory», *Physiol. Zool., 45:* 277-289; *46:* 129-138; *47:* 163-171, 1972; 1973; 1974.

Puget Sound Estuary Program, «Recommended Protocols for Conducting Laboratory Bioassays on Puget Sound Sediments», ébauche finale pour l'Environmental Protection Agency, Seattle, WA, [essai sur la croissance jusqu'au stade plutéique], 1991, 24 p.

Raymond, B.G. «Behaviour and Growth of the Early Life History Stages of *Strongylocentrotus droebachiensis*», thèse de maîtrise, département de biologie, Université Dalhousie, 1985.

Roller, R.A. et W.B. Stickle, «Effects of Salinity on Larval Tolerance and Early Developmental Rates of Four Species of Echinoderms», *Can. J. Zool., 63:* 1531-138, 1985.

Runnström, J. et B. Hagström, «The Effect of Some Oxidizing Agents Upon Fertilization and Ensuing Development of the Sea Urchin Egg», *Exper. Cell Res., 7:* 327-344, 1955.

Schilling, F.M. et D.T. Manahan, «Energetics of Early Development for the Sea Urchins *Strongylocentrotus purpuratus* and *Lytechinus pictus* and the Crustacean *Artemia* sp», *Mar. Biol., 106:* 119-127, 1990.

Stebbing, A.R.D., B. Åkesson, A. Calabrese, J.H. Gentile et R. Lloyd, «The Role of Bioassays in Marine Pollution Monitoring. Bioassay Panel Report», *Procès-verbal de la réunion du Conseil international pour l'exploration de la mer, 179:* 322-332 [bonne liste et revue], 1980.

Strathmann, R.R., «Larval Feeding in Echinoderms», *Amer. Zool., 15(3):* 717-730, 1975.

Strathmann, R.R., «General Procedures», chapitre 1, *in : Reproduction and Development of Marine Invertebrates of the Northern Pacific Coast. Data and Methods for the Study of Eggs, Embryos, and Larvae»,* M.F. Strathmann (éd.), Univ. of Washington Press, Seattle, p. 3-43, 1987.

Timourian, H., «The Effect of Zinc on Sea-urchin Morphogenesis», *J. Exp. Zool., 169:* 121-131, 1968.

Timourian, H., C.E. Hubert et R.N. Stuart, «Fertilization in the Sea-urchin as a Function of Sperm-to-Egg Ratio», *J. Reprod. Fert., 29:* 381-385, 1972.

Trieff, N. M., M. Cipollaro, G. Corsale, A. Esposito, E. Ragucci, G.G. Giordano, S.V.N. Ramanujam, D.R. Livingstone et G. Pagano, «Aroclor 1254 Toxicity in Sea Urchin Embryos and Gametes», *Exp. Oncol., 7:* 57-64, 1988.

Vaschenko, M.A., «Effects of Oil Pollution on the Development of Sex Cells in Sea Urchins», *Helgoländer Meeresunters, 33:* 297-300, 1980.

Vaschenko, M.A., «The Effect of Water Soluble Hydrocarbon Fraction of Diesel Fuel on the Development of Gametes and Quality of Offspring of the Sea Urchin *Strongylocentrotus nudus*», *Biologiya Morya 6:* 236-242, [exposition d'adultes, évaluation du développement embryonnaire avec ou sans exposition additionnelle], 1980.

Yamaguchi, M. et S. Kinoshita, «Inhibition of the Sulfated Polysaccharide Synthesis in Thiocyanate-treated Embryos of the Sea Urchin, *Clypeaster japonicus*», *Zool. Sci., 3:* 719-721, 1986.

Young, L.G. et I. Nelson, «The Effects of Heavy Metal Ions On the Motility of Sea Urchin Spermatozoa», *Biol. Bull., 147:* 236-246, 1974.

Annexe E

Série logarithmique de concentrations convenant aux essais toxicologiques*

Colonne (nombre de concentrations comprises entre 100 et 10 ou entre 10 et 1)**						
1	2	3	4	5	6	7
100	100	100	100	100	100	100
32	46	56	63	68	72	75
10	22	32	40	46	52	56
3,2	10	18	25	32	37	42
1,0	4,6	10	16	22	27	32
	2,2	5,6	10	15	19	24
	1,0	3,2	6,3	10	14	18
		1,8	4,0	6,8	10	13
		1,0	2,5	4,6	7,2	10
			1,6	3,2	5,2	7,5
			1,0	2,2	3,7	5,6
				1,5	2,7	4,2
				1,0	1,9	3,2
					1,4	2,4
					1,0	1,8
						1,3
						1,0

* Série adaptée de Rochinni *et al.*, 1982.

** On devrait choisir une série de cinq concentrations successives ou plus dans une même colonne. Des valeurs intermédiaires des concentrations de la colonne (×) se retrouvent dans la conlonne (2× + 1). Les valeurs indiquées peuvent représenter des concentrations exprimées en pourcentage de volume ou de poids, en mg/L ou en µg/L. Au besoin, on pourrait multiplier ou diviser les valeurs par n'importe quelle puissance de 10. On peut utiliser la colonne 1 lorsque le degré de toxicité suscite beaucoup d'incertitude. On ne devrait pas utiliser les concentrations plus espacées (établies au moyen d'un facteur < 0,3). Pour les essais portant sur des effluents, les concentrations des colonnes à droite de la colonne 3 donnent rarement lieu à des résultats plus précis. Les écarts moins grands des colonnes 4 à 7 peuvent être utiles dans les essais portant sur des produits chimiques qui ont un seuil d'effet abrupt.